

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA  
EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**Mariana Ortiz de Godoy**

**Diversidade e estrutura genética de *Pilosocereus jauruensis*: uma  
cactácea restrita aos enclaves de vegetação xérica no entorno do bioma  
Pantanal.**

**SÃO CARLOS - SP  
- 2016 -**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA  
EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**Mariana Ortiz de Godoy**

**Diversidade e estrutura genética de *Pilosocereus jauruensis*: uma cactácea restrita aos enclaves de vegetação xérica no entorno do bioma Pantanal.**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução. Área de Concentração: Genética e Evolução.**

**Orientação:** Prof. Dr. Evandro Marsola de Moraes

**SÃO CARLOS - SP  
- 2016 -**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G589d Godoy, Mariana Ortiz de  
Diversidade e estrutura genética de *Pilosocereus jauruensis* : uma cactácea restrita aos enclaves de vegetação xérica no entorno do bioma Pantanal / Mariana Ortiz de Godoy. -- São Carlos : UFSCar, 2015.  
81 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Cactaceae. 2. Microssatélites. 3. cpDNA. 4. *Pilosocereus*. I. Título.

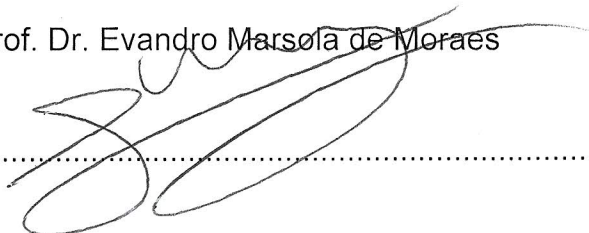
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA  
MOLECULAR

Dissertação de Mestrado de

**MARIANA ORTIZ DE GODOY**

**Banca Examinadora**

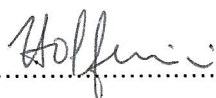
Prof. Dr. Evandro Marsola de Moraes



Prof. Dr. Fernando de Faria Franco



Profa. Dra. Vera Nisaka Solferni



Dedico à minha avó Ignez Gazzaneo, a maior  
inspiração de minha vida e incentivadora  
incansável de meus estudos (*in memoriam*).

“Nada em biologia faz sentido, exceto à luz da evolução.”

**Theodosius Dobzhansky**

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro da FAPESP (Proc. 05-55200/8) e com bolsa de Mestrado da FAPESP (Proc. 2012/12096-0).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda a minha família, em especial a minha mãe Cristina e aos meus irmãos Luis e Anita pelo apoio incondicional e por serem diretamente responsáveis pela formação da pessoa que sou hoje.

Ao meu noivo Marco Antonio por tudo o que ele representa em minha vida e por todo o apoio e incentivo para conclusão desse trabalho. Sua ajuda computacional, na elaboração das figuras e na redação. Agradeço também por estar sempre ao meu lado me dando suporte, força, coragem e compartilhando sua vida comigo.

Ao Prof. Dr. Evandro pela orientação. Por seus valiosos ensinamentos e paciência em todos os momentos.

À todos os colegas do Laboratório de Diversidade Genética e Biologia Evolutiva do campus Sorocaba da Universidade Federal de São Carlos.

Ao Prof. Dr. Fernando de Faria Franco pelas contribuições, conselhos e parceria durante as coletas.

À técnica de laboratório Heidi pela amizade e toda ajuda no dia a dia.

Às Pós Doutorandas Fernanda e Gislaire, aos Doutorandos Manolo e Isabel, às mestrandas Paulianny e Cecília e aos alunos de Iniciação Científica Viviane, Flávia, Monique, Bianca e Juliana por todos os momentos de convivência, amizade, auxílio e troca de experiências.

Aos colaboradores Nigel Taylor e Daniela Zappi, pela confirmação da identificação taxonômica das amostras coletadas em campo.

À todas as pessoas que colaboraram durante o trabalho de coleta de campo, que deram indicações de localidades, nos serviram de guias, abriram as portas de suas propriedades para que pudessemos efetuar as coletas.

Às amigas Wilma Barrionuevo, Cilene Mori e Mariana Correa, grandes irmãs que encontrei em São Carlos, sempre dispostas a me ajudar e me abrigar durante as disciplinas.

A todo o pessoal da UFSCar Sorocaba especialmente os técnicos de laboratório por toda ajuda durante esses dois anos e os amigos do departamento de Pós Graduação em Diversidade Biológica e Conservação por todos os momentos de descontração, ajuda e companheirismo.

Aos colegas e professores do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGev), pelo acolhimento e auxílio no que fosse preciso.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv), pela infra-estrutura oferecida para a realização do projeto.



À Ivanildes, secretária do PPGGEv que sempre esteve disposta a nos ajudar em tudo o que fosse possível.

À FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto e a concessão da bolsa de Mestrado.

## RESUMO

Os estudos sobre a diversidade genética e estrutura populacional de espécies naturalmente fragmentada são de grande interesse para a conservação. Essas populações fragmentadas estão mais sujeitas a endogamia e perda da diversidade genética devido aos efeitos pronunciados de isolamento e deriva genética. *Pilosocereus jauruensis* é uma espécie de cacto colunar restrita a manchas de vegetação seca sobre afloramentos rochosos que ocorrem em torno do bioma Pantanal, no sudoeste da América do Sul. Esta espécie foi recentemente retirada de sinonímia com *P. machriisi* no grupo de espécies *P. AURISSETUS* e três táxons desse grupo (*P. paraguayensis*, *P. saudadensis* e *P. densivillosus*) são atualmente sinonimizados a ela. O presente estudo tem como objetivo investigar a estrutura genética de populações de *P. jauruensis* e identificar possíveis segmentos populacionais distintos dentro desta espécie. Foram utilizados dez marcadores microssatélites em 157 indivíduos de seis populações de *P. jauruensis* e 49 indivíduos de duas populações de *P. vilaboensis*, uma espécie do grupo *P. AURISSETUS* que ocorre em regiões próximas às populações de *P. jauruensis* no Brasil central. Além disso, a variação nucleotídica em dois espaçadores plastidiais intergênicos (*trnS<sup>GCU</sup>-trnG<sup>UCC</sup>* e *trnT-trnL*) foi investigada em quatro a cinco amostras de cada população. Os índices de  $F_{ST}$  e  $G''_{ST}$  para dados SSR em *P. jauruensis* foi 0,201 e 0,559, respectivamente, revelando elevados níveis de diferenciação genética entre as populações. Três haplótipos plastidiais (Hd 0,663) de *P. jauruensis* com seis sítios polimórficos foram encontrados. As relações de similaridade entre as populações foram semelhantes entre os dois tipos de marcadores estudados. Duas populações, que ocorrem na mesma região geográfica do táxon inválido *P. saudadensis*, foram altamente diferenciadas em relação às outras populações de *P. jauruensis* e proximamente relacionadas às populações de *P. vilaboensis*. As duas populações de *P. jauruensis* que ocorrem na mesma região geográfica do táxon inválido *P. densivillosus* também foram diferenciadas em relação às populações restantes de *P. jauruensis*. Estes resultados foram incongruentes com a circunscrição taxonômica atual de *P. jauruensis* e sugerem a presença de táxons distintos dentro desta espécie.

**Palavras Chave:** Cactaceae, microssatélites, cpDNA, *Pilosocereus*.

## ABSTRACT

Studies focusing on genetic diversity and population structure of naturally fragmented taxa are of conservation concern. Such fragmented populations are more subject to endogamy and genetic diversity erosion due to the pronounced effects of isolation and genetic drift. *Pilosocereus jauruensis* is a columnar cactus species restricted to patches of xeric vegetation on rock outcrops occurring around the Pantanal biome in southwestern South America. This species has been recently resurrected from synonymy with *P. machriisi* in the *P. AURISSETUS* species group, and three taxa (*P. paraguayensis*, *P. saudadensis* e *P. densivillosus*) are synonymized with *P. jauruensis* in the current taxonomy. The present study aims to investigate the genetic population structure of *P. jauruensis* and identify possible distinct population segments within this species. We used data from four SSR markers in 157 individuals of six *P. jauruensis* populations and 49 individuals of two populations of *P. vilaboensis*, a related species occurring close to *P. jauruensis* populations in central Brazil. Furthermore, nucleotide variation in two plastid intergenic spacers (*trnS<sup>GCU</sup>-trnG<sup>UCC</sup>* and *trnT-trnL*) was investigated in four to five samples of each population. The indices  $F_{ST}$  e  $G''_{ST}$  for SSR data in *P. jauruensis* was 0.201 and 0.559 respectively, revealing high levels of genetic differentiation among populations. Three haplotypes (Hd 0.663) of *P. jauruensis* with six polymorphic sites were found in the cpDNA. NJ dendrograms showed similar relationships using SSR and cpDNA markers. Two populations, occurring in the same geographic region of the invalid taxa *P. saudadensis* were highly differentiated from other *P. jauruensis* populations. The cpDNA haplotype found in the northernmost *P. jauruensis* population was closely related with *P. vilaboensis* haplotypes. Also, two populations, occurring in the same geographic region of the invalid taxa *P. densivillosus* were highly differentiated from other *P. jauruensis* populations. These results were incongruent with the current taxonomic circumscription of *P. jauruensis* and suggest the presence of distinct taxa within this species.

**Keywords:** Cactaceae, microsatellites, cpDNA, *Pilosocereus*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribuição geográfica das populações de <i>P. jauruensis</i> .....	20
<b>Figura 2.</b> Indivíduos com flores ou frutos da espécie <i>P. jauruensis</i> .....	21
<b>Figura 3.</b> Exemplo de prancha utilizada para identificação de <i>P. Jauruensis</i> .....	28
<b>Figura 4.</b> Distribuição geográfica das populações analisadas neste estudo.....	29
<b>Figura 5.</b> Exemplos de eletroferogramas analisados com o programa <i>GeneMarker</i> v1.91.....	31
<b>Figura 6.</b> Exemplos de eletroferogramas analisados com o programa <i>PROsize</i> .....	32
<b>Figura 7.</b> Rede de haplótipos das regiões concatenadas <i>trnS<sup>GCU</sup>-trnG<sup>UCC</sup></i> e <i>trnT-trnL</i> ..	40
<b>Figura 8.</b> Representação gráfica da análise de identificação do valor mais provável de K, para todas as populações de <i>P. jauruensis</i> e <i>P. vilaboensis</i> .....	46
<b>Figura 9.</b> Resultado da análise Bayesiana implementada pelo programa STRUCTURE para todas as populações de <i>P. jauruensis</i> e <i>P. vilaboensis</i> .....	46
<b>Figura 10.</b> Representação geográfica da proporção média dos genomas individuais em cada população pertencente a cada grupo genético revelado pelo programa STRUCTURE.....	47
<b>Figura 11.</b> Representação gráfica da análise de identificação do valor mais provável de K, para as populações de <i>P. jauruensis</i> .....	48
<b>Figura 12.</b> Resultado da análise Bayesiana implementada pelo programa STRUCTURE, somente para as populações de <i>P. Jauruensis</i> .....	48
<b>Figura 13.</b> Representação gráfica da análise de identificação do valor mais provável de K, para as populações de <i>P. jauruensis</i> .....	49
<b>Figura 14.</b> Resultado da análise Bayesiana implementada pelo programa STRUCTURE, somente para as populações de <i>P. jauruensis</i> anteriormente classificadas como Grupo Norte.....	50
<b>Figura 15.</b> Relação entre o índice de fixação $G''_{ST}$ e distância geográfica considerando na análise de Mantel apenas as populações de <i>P. jauruensis</i> .....	52
<b>Figura 16.</b> Relação entre o índice de fixação $G''_{ST}$ e distância geográfica considerado na análise de Mantel para as populações de <i>P. jauruensis</i> e <i>P. vilaboensis</i> .....	53
<b>Figura 17.</b> Dendograma de <i>Neighbor-joining</i> mostrando as relações entre as populações de <i>P. jauruesis</i> e <i>P. vilaboensis</i> a partir da estimativa de $F_{ST}$ .....	58

<b>Figura 18.</b> Dendograma de <i>Neighbor-joining</i> mostrando as relações entre as populações de <i>P. jauruesis</i> e <i>P. vilaboensis</i> a partir das estimativas de <i>D</i> .....	59
<b>Figura 19.</b> Dendograma de <i>Neighbor-joining</i> mostrando as relações entre as populações de <i>P. jauruesis</i> e <i>P. vilaboensis</i> a partir da estimativa <i>Dc</i> .....	60
<b>Figura 20.</b> Prancha utilizada para identificação de <i>P. jauruensis</i> , localidade Palestina de Goiás.....	77
<b>Figura 21.</b> Prancha utilizada para identificação de <i>P. jauruensis</i> , localidade Serra da Petrovina(1).....	78
<b>Figura 22.</b> Prancha utilizada para identificação de <i>P. jauruensis</i> , localidade Serra da Petrovina(2).....	79

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Informações sobre amostras disponíveis, localidades onde foram realizadas coletas de material biológico e equipe de coleta das populações analisadas neste trabalho.....27
- Tabela 2.** Relação dos 10 locos de DNA microsatélite utilizados para as genotipagens em *Pilosocereus jauruensis*. Sequências dos iniciadores *forward* (F) e *reverse* (R), unidades repetitivas e temperaturas de anelamento (*Ta*) .....33
- Tabela 3.** Informações sobre dados genotípicos faltantes de acordo com o loco e a população específica.....41
- Tabela 4.** Índices de diversidade genética para 10 locos microsatélites de sete populações de *P. jauruensis*.....43
- Tabela 5.** Valores de  $F_{ST}$  estimados sobre os dados originais e corrigidos com a estimativa ENA para os locos que indicaram a presença de alelos nulos e estimativa de  $G''_{ST}$  por loco e seus respectivos valores de  $P$ .....45
- Tabela 6.** Análise de variância molecular para *P. jauruensis* usando o agrupamento de acordo com o resultado da análise com o programa STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000).....50
- Tabela 7.** Análise de variância molecular para *P. jauruensis* usando os agrupamentos Sul, NW e NE obtidos de acordo com os resultados das análises com o programa STRUCTURE (PRITCHARD *et al.*, 2000).....51
- Tabela 8.** Valores de  $G''_{ST}$  par a par para as sete populações de *Pilosocereus jauruensis* e as duas populações de *Pilosocereus vilaboensis* (diagonal inferior) e distância geográfica em Km (diagonal superior), utilizadas para a estimativa do Teste de Mantel.....52
- Tabela 9.** Análise de detecção de migrantes utilizando os programa GENECLASS2 (Piry *et al.* 2004) e STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000).....54
- Tabela 10.** Análise da alteração do equilíbrio mutação-deriva mostrando a probabilidade de excesso e deficiência de heterozigotos e probabilidade de ocorrência de gargalo populacional recente utilizando o modelo TPM e teste de probabilidade de Wilcoxon.....55
- Tabela 11.** Valores de  $F_{ST}$  par a par para as sete populações de *Pilosocereus jauruensis* e as duas populações de *Pilosocereus vilaboensis* utilizadas para elaboração do dendograma *Neighbour-Joining*.....56
- Tabela 12.** Valores de  $Dc$  par a par para as sete populações de *Pilosocereus jauruensis* e as duas populações de *Pilosocereus vilaboensis* utilizadas para elaboração do dendograma *Neighbour-Joining*.....57

<b>Tabela 13.</b> Valores de <i>D</i> par a par para as sete populações de <i>Pilosocereus jauruensis</i> e as duas populações de <i>Pilosocereus vilaboensis</i> utilizadas para elaboração do dendograma <i>Neighbour-Joining</i> .....	57
<b>Tabela 14.</b> Índices de diversidade genética para cada um dos 10 locos microssatélites por população de <i>P. jauruensis</i> .....	80

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1 GENÉTICA DE POPULAÇÕES EM PLANTAS.....	16
1.2 FAMÍLIA CACTACEAE.....	17
1.2.1 Genero <i>Pilosocereus</i> .....	19
1.2.2 <i>Pilosocereus jauruensis</i> .....	20
1.3 MARCADORES MICROSSATÉLITES.....	22
1.4 MARCADORES DO GENOMA PLATIDIAL.....	23
1.5 JUSTIFICATIVA.....	24
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
3.1 AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DE DNA.....	26
3.2 ANÁLISE DA VARIAÇÃO EM <i>cpDNA</i> .....	29
3.3 LOCOS DE DNA MICROSSATÉLITE.....	31
3.4 ANÁLISE DOS DADOS SSR.....	33
3.4.1 Validação dos dados genotípicos.....	33
3.4.2 Diversidade Genética.....	34
3.4.3 Estrutura Genética Populacional.....	34
3.4.4 Correlação Genética e Geográfica (Teste de Mantel).....	36
3.4.5 Detecção de Migrantes.....	36
3.4.6 Gargalos Populacionais (Bottleneck).....	37
3.4.7 Relações de Similaridade Genética entre Populações.....	37
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
4.1 ANÁLISE DA VARIAÇÃO EM <i>cpDNA</i> .....	39
4.2 GENOTIPAGEM DOS LOCOS DE DNA MICROSSATÉLITE.....	40



4.3 ANÁLISES DOS DADOS SSR.....	42
4.3.1 Validação dos genótipos obtidos.....	42
4.2.2 Diversidade Genética.....	43
4.3.3 Estrutura Genética Populacional.....	44
4.3.4 Correlação Genética e Geográfica (Teste de Mantel).....	51
4.2.5 Identificação de Migrantes.....	53
4.2.6 Gargalo Populacional.....	55
4.2.7 Relações de Similaridade Genética.....	56
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>76</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 GENÉTICA DE POPULAÇÕES EM PLANTAS

Populações de espécies vegetais com distribuição naturalmente fragmentada geralmente sofrem um risco elevado de extinção devido ao tamanho populacional reduzido e ao isolamento espacial (FRANKHAM, 2005; YOUNG *et al.*, 1996). A teoria da Genética de Populações prediz que a distribuição fragmentada ocasiona erosão da diversidade genética e acentuada diferenciação interpopulacional. Esses efeitos são resultados da elevada deriva genética e endogamia dentro das populações e do reduzido fluxo gênico (LESICA; ALLENDORF, 1995; FRANKHAM, 2005; HAMILTON; ECKERT, 2007; HOLSINGER; WEIR, 2009). Como consequência, enquanto a diminuição da heterozigosidade pode reduzir a aptidão individual e comprometer a viabilidade da população em um tempo relativamente curto, a diminuição da riqueza alélica pode limitar a capacidade das populações de superarem novas pressões seletivas (FRANKHAM, 2005; YOUNG *et al.*, 1996). Em um período de tempo mais curto, a endogamia pode causar a exposição de um número maior de alelos recessivos deletérios à ação da seleção natural negativa, aumentando o número de indivíduos com valor adaptativo abaixo da média populacional. Em conjunto com outros processos estocásticos, como a ocorrência de catástrofes naturais e variações ambientais, a expectativa é que estes fatores aumentem as chances de extinção das populações (OUBORG *et al.*, 2006).

Em plantas, além do padrão de distribuição geográfica, o sistema de cruzamento, os mecanismos de polinização, a dispersão de sementes e a longevidade dos indivíduos são também fatores importantes para o nível e a distribuição da variação genética dentro e entre populações (LOVELESS; HAMRICK, 1984). Por exemplo, espécies com sobreposição de gerações geralmente exibem níveis mais elevados de variação genética em comparação a espécies com tempo de vida curto, pois a longevidade possibilita o acúmulo de mais genótipos diferentes dentro das populações (JONES *et al.*, 2005). O nível de diferenciação genética entre populações também depende das características dos vetores de movimento de pólen e de sementes. Espécies cuja polinização e dispersão de sementes são promovidas por animais geralmente exibem níveis menores de variação genética dentro das populações e maior diferenciação genética entre elas quando comparadas com espécies polinizadas e com dispersão de sementes promovidas pelo vento (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

Outra dificuldade importante para a conservação de espécies vegetais com distribuição naturalmente fragmentada é a frequente existência de incertezas taxonômicas devido ao elevado nível de variação morfológica entre as populações, limitando a eficiência de programas conservacionistas baseados na espécie como unidade de conservação (ENNOS *et al.*, 2005). De acordo com a literatura, o limitado fluxo gênico (via semente ou pólen) e/ou pressões seletivas diversas pode ocasionar o acúmulo de acentuadas diferenças morfológicas entre as populações, cujo espectro de variação nem sempre possui limites geográficos concordantes entre as diferentes características (BARBOSA *et al.*, 2012). Tal padrão de variação morfológica geralmente torna a classificação das espécies e suas subespécies problemática, causando discordância entre os taxonomistas do grupo em estudo (BAKER; BUTTERWORTH, 2013).

## ***1.2 FAMÍLIA CACTACEAE***

A família Cactaceae, pertencente a ordem Caryophyllales, desenvolveu diversas adaptações ao ambiente xérico (LANDRUM, 2002). Essa família de plantas é caracterizada pela capacidade de absorção de grande quantidade de água, a qual fica armazenada para utilização em períodos de escassez hídrica, e pela tendência da diminuição na razão superfície/volume, apresentando comumente o formato esférico (FAHN; CUTLER, 1992). Outras características peculiares é a realização de fotossíntese pelo cladódio (a parte aérea da planta) e a presença de aréolas ao longo do cladódio, as quais são gemas axilares modificadas de onde originam os espinhos e as estruturas reprodutivas (GIBSON; NOBEL, 1986).

Essa família encontra-se dividida taxonomicamente em três subfamílias: Pereskioideae, Opuntioideae e Cactoideae (HUNT; TAYLOR, 1990). Compreende cerca de 127 gêneros e aproximadamente 1500 espécies, distribuídas quase que exclusivamente nas regiões tropicais da América (HUNT *et al.*, 2006), ocorrendo especialmente em áreas de condições xéricas, em ambientes terrestres, epífitos ou rupícolas (ANDERSON, 2001). Os principais centros de diversidade da família localizam-se nas regiões áridas entre os EUA e México, na região dos Andes, e no leste do Brasil.

Entre as 227 espécies reconhecidas até o momento no Brasil, 176 são endêmicas (TAYLOR; ZAPPI, 2004). A região leste do Brasil abriga um dos três centros de diversidade da família Cactaceae, com grande parte das espécies apresentando

distribuição fragmentada, restrita a enclaves de habitats xéricos em meio a ambientes ecologicamente desfavoráveis (TAYLOR; ZAPPI, 2004). Embora a Caatinga abrigue a maior abundância de cactáceas, com muitas espécies exibindo distribuição ampla e relativamente homogênea, a maior diversidade de cactáceas está associada aos ambientes rupícolas na porção sul da Caatinga e espalhados pelo domínio Cerrado (TAYLOR; ZAPPI, 2004). A distribuição fragmentada das cactáceas fora da Caatinga tem sido interpretada como resultado da fragmentação de uma distribuição mais ampla da vegetação xérica no leste da América do Sul durante os períodos interglaciais do Quaternário (MORAES *et al.*, 2009; TAYLOR, 2012; FRANCO *et al.*, 2013; BONATELLI *et al.*, 2014).

Entre as espécies de cactáceas com ocorrência no Brasil (ZAPPI *et al.*, 2010), sete espécies foram objeto de análises de diversidade genética ou estrutura populacional, envolvendo marcadores isoenzimáticos (MORAES *et al.*, 2005; LAMBERT *et al.*, 2006a, 2006b). Entre essas, três são pertencentes ao grupo *P. AURISSETUS* (*P. machrisii*, *P. aureispinus* e *P. vilaboensis*).

Considerando a diversidade genética nessas espécies analisadas do grupo *P. AURISSETUS* e de outras duas espécies venezuelanas do mesmo gênero (*P. lanuginosus* e *P. tillianus*), Figueredo *et al.* (2010) concluíram que o gênero *Pilosocereus* exhibe níveis maiores de diversidade genética na América do Sul em comparação com outras 15 espécies de cactos colunares investigadas no Brasil, México, EUA e Venezuela. Embora esses trabalhos relatem resultados importantes para a conservação das espécies, como elevada estrutura populacional, altos índices de endogamia e ocorrência de hibridização com outras espécies (LAMBERT *et al.*, 2006a), a realização de análises mais detalhadas fica limitada pelo baixo nível de polimorfismo inerente ao marcador utilizado.

Apenas recentemente um conjunto de marcadores microssatélites foram desenvolvidos e caracterizados para cactáceas brasileiras envolvendo espécies do grupo *P. AURISSETUS* (PEREZ *et al.*, 2011; MORAES *et al.*, 2012), permitindo uma análise mais acurada da diversidade genética nessas espécies. Moraes *et al.* (2012) e Bonatelli *et al.* (2014) realizaram análises sobre a variação genética para sete espécies pertencentes à esse mesmo grupo utilizando marcadores de DNA plastidial, nucleares e DNA microssatélite. Para todos os casos relativos a espécies pertencentes ao grupo *P. AURISSETUS*, foram observados altos níveis de diversidade genética e deficiência de heterozigotos, além de elevada estrutura genética nas populações de *P. machrisii*. Os

autores atribuíram a diversidade observada nessas espécies como resultado de conexões históricas entre as populações durante períodos climáticos favoráveis do Quaternário para a expansão geográfica das populações (MORAES *et al.*, 2005 e 2012; BONATELLI *et al.*, 2014).

### **1.2.1 Gênero *Pilosocereus***

Situado na subfamília Cactoideae, tribo Cereeae (HUNT; TAYLOR, 1990), o gênero *Pilosocereus* é caracterizado pelos ramos colunares, flores relativamente curtas, tubo floral glabro, aréolas com a presença de tricomas e frutos depresso-globosos, deiscentes (ZAPPI, 1994).

Entre os gêneros de Cactaceae com ocorrência no Brasil, *Pilosocereus* é um dos três mais diversos, abrangendo 41 espécies de cactos colunares com ocorrência no leste e centro-oeste do Brasil (ZAPPI, 1994; TAYLOR; ZAPPI, 2004). *Pilosocereus* é um gênero considerado taxonomicamente complexo por não ter os limites de grande parte das suas espécies satisfatoriamente resolvidos (HUNT *et al.*, 2006). As espécies do gênero são subdivididas em dois subgêneros, *Gounellea*, com somente duas espécies (*P. gounellei* e *P. tuberculatus*), e *Pilosocereus*, o qual é subdividido em cinco grupos taxonômicos informais (*P. ARRABIDAE*, *P. PENTAEDROPHORUS*, *P. LEUCOCEPHALUS*, *P. AURISSETUS* e *P. PIAUHIENSIS*) com base em descontinuidades morfológicas e na distribuição geográfica das espécies (TAYLOR; ZAPPI, 2004; HUNT *et al.*, 2006).

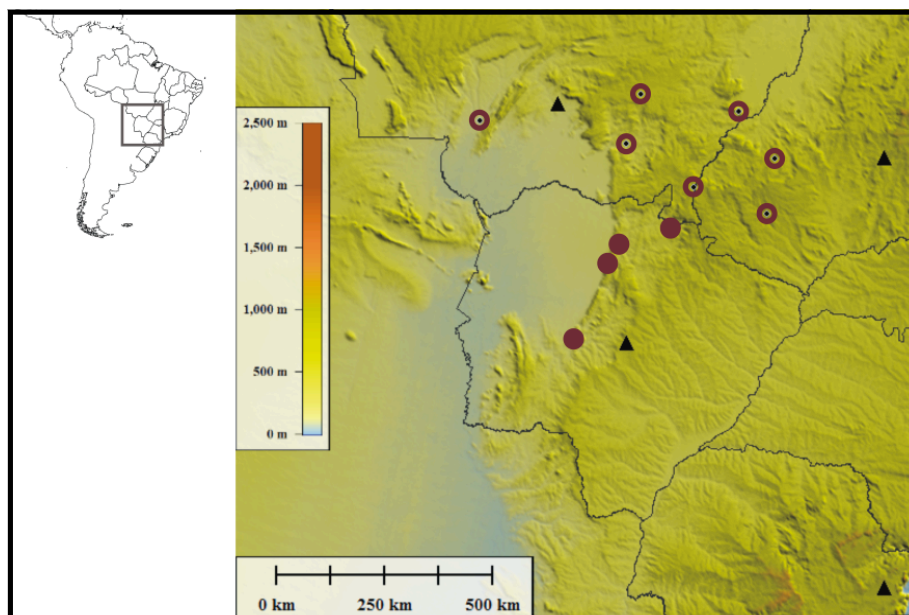
Entre esses grupos taxonômicos informais, o grupo *P. AURISSETUS* é composto por oito espécies: *P. aurisetus* (Werderm.) Byles e G.D. Rowley, *P. machrisii* (E.Y. Dawson) Backeb., *P. vilaboensis* (Diers e Esteves) P.J. Braun, *P. jauruensis* (Buining e Brederoo) P.J. Braun, *P. aureispinus* (Buining e Brederoo) F. Ritter, *P. bohlei* Hofacker, *P. parvus* (Diers e Esteves) P.J. Braun, and *P. pusillibaccatus* P.J. Braun e Esteves. As espécies desse grupo possuem distribuição restrita às manchas de afloramentos rochosos ou habitats arenosos sobre o topo de montanhas espalhadas no domínio Cerrado, geralmente associadas a vegetação de campos rupestres (ZAPPI, 1994). A grande variação morfológica entre as populações do grupo *P. AURISSETUS* tem provocado uma história taxonômica instável, com várias espécies sendo inseridas ou removidas de sinonímia e novos táxons sendo descritos (ZAPPI, 1994; TAYLOR; ZAPPI, 2004; HUNT *et al.*, 2006). Por exemplo, três táxons considerados anteriormente sinonímias de *P. machrisii* (*P. jauruensis*, *P. parvus* e *P. pusillibuccatus*) foram

recentemente considerados espécies válidas por Hunt *et al.* (2006). Essas populações apresentam diferenças morfológicas importantes em relação à *P. machrisii*, a espécie com a distribuição mais ampla no grupo, e ocupam áreas restritas localizadas nas bordas da distribuição dessa espécie.

### 1.2.2 *Pilosocereus jauruensis*

A espécie *P. jauruensis* apresenta uma distribuição bastante disjunta e restrita ao entorno do bioma Pantanal. Ocorre em elevadas altitudes em enclaves de campos rupestres dentro do domínio Cerrado nessa região, principalmente associadas a afloramentos rochosos areníticos, quartzíticos ou de rocha calcária. Os registros da distribuição dessa espécie na literatura (Figura 1) relatam sua ocorrência no centro e norte do estado de Mato Grosso do Sul, sul de Mato Grosso, sudoeste de Goiás e nordeste do Paraguai (HUNT *et al.*, 2006). Embora a distribuição de *P. jauruensis* esteja na borda da área de ocupação do grupo e destacada em relação às outras espécies do grupo, as populações com ocorrência na Serra dos Caiapós (sudoeste de Goiás) estão próximas cerca de 200 km das populações de *P. vilaboensis*, na região da Serra dos Pireneus em Goiás.

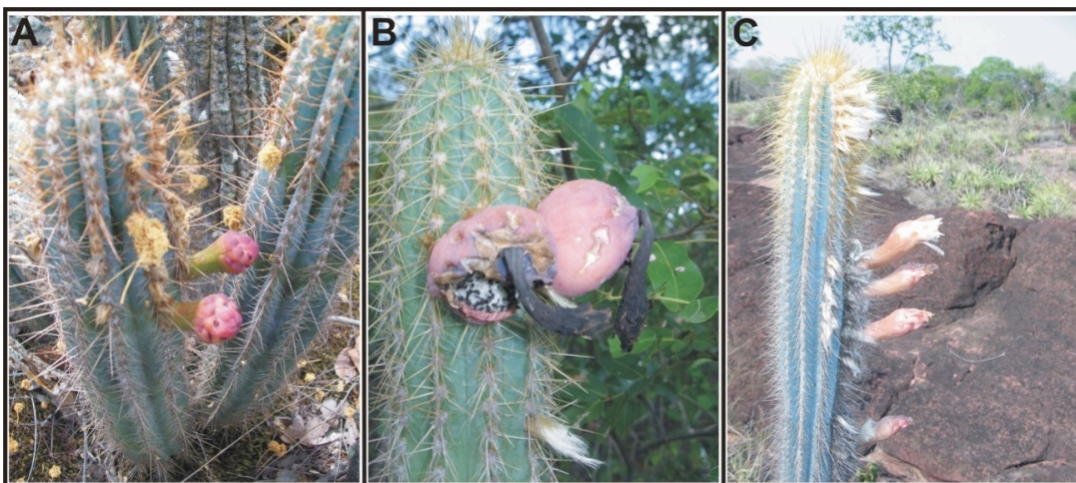
**FIGURA 1** - Distribuição geográfica das populações de *P. jauruensis*.



Fonte: Elaborado pela autora. Os círculos cheios indicam a localização das populações no estado de Mato Grosso do Sul onde já foram realizadas coletas de amostras. Os círculos vazados indicam locais nos estados de Mato Grosso e Goiás onde há relatos da ocorrência da espécie. Os triângulos indicam as capitais dos estados.

*Pilosocereus jauruensis* é uma planta de hábito arbustivo, atingindo até 1,75 m de altura, com cladódios eretos e ramificados na base. As aréolas de florescimento apresentam tricomas com coloração de dourado a marrom. As flores têm formato funeiforme e possuem antese noturna, características compatíveis com a síndrome de polinização por morcegos, sendo que aves e abelhas também são consideradas possíveis polinizadores para outras espécies do gênero com características semelhantes (ZAPPI, 1994; MUNGUÍA-ROSAS *et al.*, 2010). Os frutos possuem coloração vermelho ou esverdeado com polpa branca e diminutas sementes pretas (BREDEROO; THEUNISSEN, 1978; BRAUN, 1986), como demonstrado pela Figura 2. Estudos com outras espécies do gênero *Pilosocereus* apontam que pássaros (GOMES *et al.*, 2008), formigas (MUNGUÍA-ROSAS *et al.*, 2009) e morcegos (ZAPPI, 1994) são dispersores importantes de sementes dessas plantas, de forma que eles também podem contribuir para a síndrome de dispersão de *P. jauruensis*.

**FIGURA 2** - Indivíduos com flores ou frutos da espécie *P. jauruensis*.



Fonte: Laboratório de Diversidade Genética e Evolução (UFSCar – Sorocaba). Localidades: (A) Alcinópolis-MS, (B) Rio Verde de Mato Grosso-MS e (C) Aquidauana-MS.

Assim como ocorre para outras espécies do grupo *P. AURISSETUS*, há discordância no arranjo taxonômico de *Pilosocereus* na região de ocorrência de *P. jauruensis*. Hunt *et al.* (2006) não reconhecem a validade dos táxons *P. paraguayensis* F. Ritter 1979 (Paraguai), *P. saudadensis* F. Ritter 1979 (Serra do Roncador em Mato Grosso) e *P. densivillosus* P. J. Braun e Esteves 1994 (Serra do Caiapó em Goiás) descritos com base em diferenças morfológicas, mantendo-os como sinônimas de *P. jauruensis*.

### ***1.3 MARCADORES MICROSSATÉLITES***

Os locos de DNA microssatélite são atualmente os marcadores moleculares codominantes mais utilizados em estudos populacionais e ecológicos para estimar parâmetros como estrutura populacional, taxa de migração, tamanho populacional efetivo, ocorrência de flutuações recentes no tamanho populacional e grau de parentesco entre indivíduos (OLIVEIRA *et al.*, 2006; CHAPUIS; ESTOUP, 2007). Essa classe de DNA consiste de pequenos blocos de dois a seis pares de bases repetidos em série (TÓTH *et al.*, 2000) que ocorrem em alta frequência e bem distribuídos ao longo do genoma. Devido ao fato de geralmente estarem localizados em regiões não-codificadoras (HANCOCK, 1995), os marcadores microssatélites são assumidos na maioria das vezes como seletivamente neutros. Devido a sua elevada taxa de mutação (SCHLÖTTERER, 2000), estes marcadores geralmente possuem elevado polimorfismo, podendo fornecer dados estatisticamente precisos para quantificar parâmetros populacionais. Os locos de microssatélite são classificados como perfeitos, imperfeitos, interrompidos ou compostos, de acordo com o tipo de repetição. Locos imperfeitos ou interrompidos são aqueles cuja sequência de repetição é interrompida por um par de base ou uma sequência curta, respectivamente, enquanto que locos compostos possuem dois ou mais tipos de repetições adjacentes (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A dinâmica de evolução dos microssatélites pode diferir entre os locos de acordo com características de sua estrutura, como número e tamanho da unidade de repetição, nível de perfeição da sequência de repetição e características das regiões flanqueadoras (BHARGAVA; FUENTES, 2010). Um dos modelos de evolução considerado para os microssatélites é o *Stepwise Mutation Model* (SMM) (OHTA; KIMURA, 2007), no qual cada novo alelo surge pela adição ou decréscimo de uma única unidade de repetição. Adotando o SMM, a relação genealógica entre os alelos pode ser conhecida e considerada em conjunto com a informação da sua frequência, permitindo obter informações importantes sobre as relações genéticas entre populações. No entanto, dificilmente locos imperfeitos ou interrompidos seguem estritamente o SMM, e outros modelos de evolução que consideram a mudança de mais de uma unidade de repetição por evento mutacional (p. ex. *Two-Phase Model* e *K-Allele Model*) (DI RIENZO *et al.*, 1994; CROW; KIMURA, 1970) parecem ser mais realísticos (BHARGAVA; FUENTES, 2010). Devido ao tipo da variação dos microssatélites e à restrição no aumento indefinido do número de repetições nos locos (NAUTA; WEISSING, 1996), para todos esses modelos é esperado uma fração de homoplasia entre os alelos (homoplasia de tamanho), causando uma subestimativa da diversidade genética e do nível de diferenciação entre as populações (VIARD *et al.*, 1998).



#### **1.4 MARCADORES DO GENOMA PLATIDIAL**

As plantas apresentam dois genomas citoplasmáticos: mitocondrial e plastidial. Ao contrário do mtDNA dos animais, o mtDNA das plantas possui um tamanho relativamente grande e muito variável entre grupos (200 a 2.400 kb), extensiva recombinação intramolecular e uma baixa taxa de substituição nucleotídica (100 vezes menor que dos animais), sendo pouco adequado para estudos populacionais (AVISE, 2009).

Em plantas, as regiões não codificadoras do genoma plastidial (cpDNA) têm sido amplamente usadas para inferir filogenias (SHAW *et al.*, 2007). Além disso, embora a taxa de substituição neste genoma seja menor que aquela verificada em DNA mitocondrial animal (AVISE, 2009), a grande maioria dos estudos intra-específicos em plantas tem utilizado o genoma plastidial como marcador da variação genética (HUGHES *et al.*, 2006). Similar ao DNA mitocondrial animal, o genoma plastidial pode ser considerado como uma única unidade de herança não-recombinante, facilitando a interpretação evolutiva dos padrões de variação. Outra vantagem é o seu padrão uniparental de herança (maternal na maioria das Angiospermas), levando a uma taxa de evolução rápida devido ao seu reduzido tamanho efetivo (RAVI *et al.*, 2008).

O genoma plastidial é constituído geralmente por duas regiões únicas, uma longa e outra mais curta, as quais são separadas por segmentos repetidos e inversos. Dentro da região longa (large single-copy - LSC) há vários segmentos não codificadores constituídos de *introns* ou espaçadores entre genes. A taxa de mutação do cpDNA varia para diferentes regiões do genoma, sendo que a maioria da variação aparentemente ocorre dentro da região longa (SHAW *et al.*, 2005, 2007). O uso de iniciadores universais para essas regiões não-codificadoras (TABERLET *et al.*, 1991; DESMASURE *et al.*, 1995; DUMOLIN-LAPEGUE *et al.*, 1997; SHAW *et al.*, 2005 e 2007) tem possibilitado a realização de estudos intra-específicos em um amplo espectro taxonômico de espécies vegetais (CAETANO *et al.*, 2008; NOVAES *et al.*, 2010). Shaw *et al.* (2007) compararam a região de cópia única de três pares de genomas plastidiais de angiospermas e identificaram 13 regiões de elevado polimorfismo. Nessas regiões os autores identificaram nove segmentos espaçadores que apresentaram nível de variação maior que a encontrada nos 21 segmentos descritos em um estudo anterior (SHAW *et al.*, 2005), mostrando-se bastante adequados como marcadores para estudos populacionais (SHAW *et al.*, 2007).

Recentemente, Bonatelli *et al.* (2013) demonstraram que os espaçadores intergênicos *trnS<sup>GCU</sup>-trnG<sup>UCC</sup>* e *trnT-trnL* apresentaram a maior variação intrapopulacional dentre oito regiões analisadas para o grupo de espécies *P. AURISSETUS*, as quais estão entre as mais utilizadas em estudos filogeográficos de angiospermas. Também para o grupo *P. AURISSETUS*, Dias (2013) verificou que as regiões *psbD-trnT* e *petL-psbE* apresentaram relativamente elevada variação intrapopulacional, interpopulacional e interespecífica, apontando que são regiões do genoma plastidial indicadas para estudos filogeográficos dentre os sete segmentos testados pela autora.

### **1.5 JUSTIFICATIVA**

Com base na constatação de que muitas espécies ameaçadas de extinção ocorrem em populações pequenas e isoladas (OUBORG *et al.*, 2006), táxons que possuem distribuição fragmentada e restrita a pequenas manchas de habitats adequados, como é o caso de *P. jauruensis*, geralmente são objeto de grande atenção para estudos sobre genética da conservação. Outro fator complicador na conservação dessas espécies são as incertezas taxonômicas decorrentes da substancial variação morfológica local, como ocorre comumente na família das cactáceas e no gênero *Pilosocereus* em particular. A espécie alvo desse estudo foi recentemente retirada de sinonímia de *P. machrisii* e atualmente possui três morfotipos a ela sinonimizados (*P. paraguayensis*, *P. saudadensis* e *P. densivilosus*) (HUNT *et al.*, 2006). Desta forma, a análise da estrutura genética nas populações de *P. jauruensis* permitirá um melhor conhecimento sobre a distribuição da variação genética dentro e entre populações e sobre o nível de fluxo gênico interpopulacional, contribuindo para o entendimento da história evolutiva deste táxon. Este conhecimento poderá revelar linhagens distintas dentro de *P. jauruensis*, subsidiar propostas de criação de novas unidades de conservação e auxiliar ações de manejo que visem a restauração genética de populações.

Este projeto contribui para o andamento de um projeto mais amplo em desenvolvimento pelo nosso grupo de pesquisa que possui como objetivos principais investigar a diversidade genética, história evolutiva e a estrutura filogeográfica em cactáceas na América do Sul.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo deste projeto é analisar a estrutura genética populacional em *P. jauruensis* utilizando marcadores microssatélites e sequências do genoma plastidial, avaliar a importância do fluxo gênico na manutenção da diversidade genética e estrutura das populações estudadas. Um segundo objetivo é verificar se o padrão de distribuição da variação genética entre as populações de *P. jauruensis* revela a presença de segmentos populacionais com distinção genética suficiente para indicar a presença de outros táxons atualmente sinonimizados com essa espécie.

As informações moleculares geradas neste estudo serão utilizadas para cumprir os seguintes objetivos específicos: (1) verificar o nível e o padrão de distribuição da variação genética dentro e entre as populações de *P. jauruensis*; (2) avaliar a importância do fluxo gênico recente na estrutura genética das populações estudadas; (3) verificar a ocorrência de reduções populacionais drásticas e recentes; (4) identificar possíveis incongruências no arranjo taxonômico atual envolvendo *P. jauruensis*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DE DNA

Foram analisadas amostras de diferentes populações que abrangem a distribuição conhecida de *P. jauruensis*, incluindo as localidades de ocorrência dos morfotipos sinonimizados com *P. jauruensis* (*P. saudadensis*, *P. densivillosus*, syn.) que ocorrem nos estados de Mato Grosso e Goiás. O morfotipo sinonimizado de ocorrência no Paraguai (*P. paraguayensis*, syn.) não teve nenhuma população amostrada devido a restrições legais que envolvem a coleta de material biológico em outro país.

As amostras de quatro populações com ocorrência em Mato Grosso do Sul, totalizando 75 indivíduos, foram provenientes da coleção de tecidos no Laboratório de Diversidade Genética e Evolução da UFSCar. Outras três populações com ocorrência em Mato Grosso e Goiás foram amostradas neste trabalho durante a realização de uma expedição de campo em setembro de 2012 para esses estados. Foram visitadas localidades de possível ocorrência de *P. jauruensis* no entorno dos municípios de Jataí-GO, Caiapônia-GO, Barra do Garças-MT, Primavera do Leste-MT, Poconé-MT, Cáceres-MT, Rondonópolis-MT, Alto Garças-MT e Mineiros-GO. Foram encontradas e amostradas duas populações de *P. jauruensis* em Goiás e uma população em Mato Grosso, totalizando a amostragem de 82 indivíduos.

Para todas as coletas realizadas foram obtidos segmentos da raiz de oito a 34 indivíduos por população (Tabela 1). Em cada localidade foi realizado esforço para coleta de ao menos 30 indivíduos. No entanto, o tamanho da amostra foi limitado pelo número de indivíduos na localidade e pela restrição de uma distância mínima de 10 metros entre cada indivíduo amostrado a fim de se evitar coleta de clones. Para a armazenagem do material obtido foi utilizado sílica gel para secagem em campo e no laboratório as amostras foram limpas e secas para serem conservadas em ultrafreezer.

**TABELA 1** - Informações sobre amostras disponíveis, localidades onde foram realizadas coletas de material biológico e equipe de coleta das populações analisadas neste trabalho.

Localidade	Código	Nº indivíduos	Data da coleta	Equipe de coleta
<i>Pilosocereus jauruensis</i>				
Aquidauana-MS	AQU	34	17/09/2009	Evandro, Manolo e Marcelo
Rio Verde de Mato Grosso-MS	RVE	20	20/09/2009	Evandro e Manolo
Alcinópolis-MS	ALC	08	21/09/2009	Evandro e Manolo
Coxim-MS	COX	13	17/02/2011	Marlon
Palestina de Goiás- GO	PGO	20	02/09/2012	Evandro, Mariana e Fernando
Serra de Petrovina- MT	PET	30	07/09/2012	Evandro, Mariana e Fernando
Mineiros-GO	MIN	32	08/09/2012	Evandro, Mariana e Fernando
<i>Pilosocereus vilaboensis</i>				
Goiás Velho-GO	GOV	22	11/01/2009	Evandro, Manolo e Fernando
Pirenópolis-GO	PIR	27	12/01/2009	Evandro, Manolo e Fernando

Fonte: Laboratório de Diversidade Genética e Evolução (UFSCar – Sorocaba).

A identificação das espécies foi realizada segundo descrições das características morfológicas de acordo com os trabalhos de Zappi (1994) e Hunt *et al.* (2006). Posteriormente, essa identificação foi confirmada pelo Dr. Nigel Taylor (Singapore Botanic Gardens) e pela Dra. Daniela Zappi (Royal Botanic Garden) a partir de pranchas fotográficas das plantas no campo (Figura 3 e ANEXOS de 1 a 3).

**FIGURA 3** - Exemplo de prancha utilizada para identificação de *P. jauruensis*.

**PRANCHA 4- Mineiros-GO**

Identificada como *Pilosocereus jauruensis*

Observação: durante a noite a flor aberta tem cheiro forte, adocicado e parecido com cheiro de carne.



**PRANCHA 5 - Mineiros-GO**

Identificada como *Pilosocereus jauruensis*

Observação: durante a noite a flor aberta tem cheiro forte, adocicado e parecido com cheiro de carne.

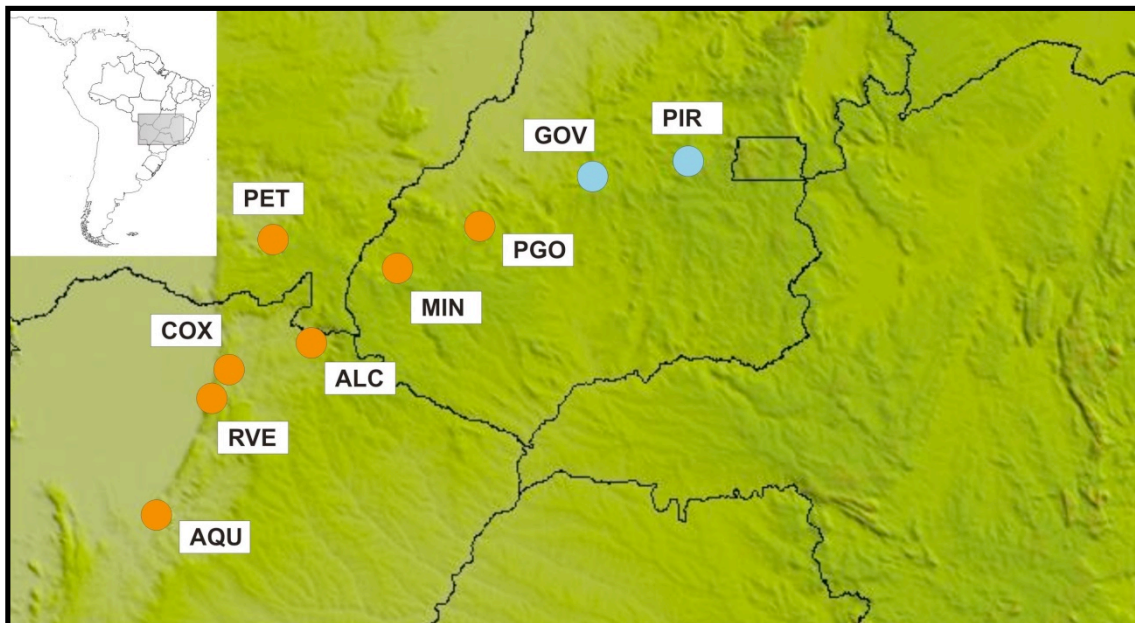


Fonte: Elaborado pela autora. Pranchas enviadas para os taxonomistas do grupo Dr. Nigel Taylor (Singapore Botanic Gardens) e pela Dra. Daniela Zappi (Royal Botanic Garden).

Em função das populações de *P. jauruensis* amostradas no estado de Goiás (Mineiros-GO e Palestina de Goiás-GO) estarem geograficamente próximas da área de

distribuição de *P. vilaboensis* (Figura 4), as amostras de duas populações dessa espécie (Pirenópolis-GO e Goiás-GO) foram incorporados nas análises. A inclusão das populações de *P. vilaboensis* permitiu avaliar as relações de proximidade genética nos marcadores analisados entre as populações das duas espécies e também utilizar o nível de diferenciação genética interespecífica como um parâmetro de avaliação para a investigação da presença de táxons distintos dentro de *P. jauruensis*.

**FIGURA 4** - Distribuição geográfica das populações analisadas neste estudo.



Fonte: Elaborado pela autora. Os círculos laranja indicam a localização das populações de *P. jauruensis*. Os círculos azuis indicam as localidades das populações de *P. vilaboensis* também incluídas nesse estudo. Os códigos das populações seguem aqueles descritos na Tabela 1.

As extrações de DNA foram realizadas a partir da maceração em nitrogênio líquido de 100 mg de tecido de raiz de cada indivíduo e adotando os procedimentos descritos no protocolo do kit comercial Dneasy Plant Mini Kit (QIAGEN). Nesta etapa foi adotada a modificação sugerida por Helsen *et al.* (2007), a qual indica uma centrifugação adicional de cinco minutos a 13.200 rpm (FCR: 16.110 g), empregada posteriormente à lise celular, de forma a remover mais eficientemente os resíduos de polissacarídeos.

### 3.2 ANÁLISE DA VARIACÃO EM *cpDNA*

Os espaçadores do genoma plastidial *trnS<sup>GCU</sup>-trnG<sup>UCC</sup>* e *trnT-trnL* foram amplificados por PCR e sequenciados em uma amostra de quatro a cinco indivíduos

para cada uma das populações amostradas de *P. jauruensis* e para as duas populações de *P. vilaboensis*. As relações genealógicas entre os haplótipos dessas duas regiões concatenadas foram analisadas com o objetivo de investigar as relações filogenéticas entre as populações das duas espécies. Esses dois marcadores foram escolhidos com base no trabalho de Bonatelli *et al.* (2013), o qual demonstrou que os espaçadores *trnS<sup>GCU</sup>-trnG<sup>UCC</sup>* e *trnT-trnL* apresentaram a maior variação intra e interpopulacional nas espécies do grupo *P. AURISSETUS* entre oito regiões analisadas do genoma plastidial.

A região *trnT-trnL* foi amplificada usando os iniciadores TabA e TabB desenvolvidos por Taberlet *et al.* (1991) em um volume de 20 µl contendo 1X tampão de reação [100 mM Tris-HCl (pH 8,8), 500 mM KCl, 0,8% Nonidet P40], 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200µM de cada dNTP, 0,1µM de cada iniciador, 1,25U de Taq DNA polimerase (Fermentas, Burlington, Ontário, Canadá) e 1µl de DNA (0,5-10ng). O espaçador *trnS<sup>GCU</sup>-trnG<sup>UCC</sup>* foi amplificado em duas porções (*3'trnS-trnG* e *5'trnS-trnG*), seguindo o protocolo descrito em Bonatelli *et al.* (2013). Para a amplificação da região *3'trnS-trnG* foram utilizados os iniciadores *5'trnG2S* (SHAW *et al.*, 2005) e *SGFwd2* (BONATELLI *et al.*, 2013) e para a região *5'trnStrnG* foram utilizados os iniciadores *trnS<sup>GCU</sup>* (SHAW *et al.*, 2005) e *SGRev2* (BONATELLI *et al.*, 2013). As concentrações dos reagentes na PCR foram as mesmas das utilizadas para amplificação do espaçador *trnT-trnL*, com exceção da concentração de MgCl<sub>2</sub> e Taq polimerase, para os quais foram usados 1,5 mM e 1U, respectivamente. As condições físicas para essas reações foram: desnaturação inicial de 80°C por 5 min., 30-40 ciclos de desnaturação de 95°C por 1 min., hibridização de 50°C (*trnT-trnL*) e 62°C (*3'trnS-trnG* e *5'trnS-trnG*) por 1 min. e extensão de 65°C por 5 min., seguidos de extensão final de 65°C por 5 min.

Os produtos de PCR foram purificados com *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare, Piscataway, New Jersey, USA). Ambas as fitas de DNA foram sequenciadas usando os mesmos iniciadores da amplificação. Os sequenciamentos foram realizados no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Campus Jaboticabal com o sequenciador ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, USA) e o kit de sequenciamento Big Dye terminator 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, USA).

A leitura dos cromatogramas resultantes do sequenciamento foi feita com o auxílio do programa CHROMASPRO 1.5 (Technelysium Pty Ltd., Tewantin,



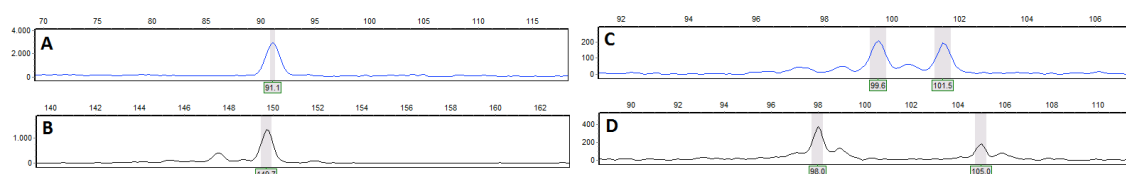
Austrália), o qual foi utilizado para alinhar ambas as fitas e resolver possíveis incongruências nos cromatogramas de cada indivíduo. As sequências foram alinhadas no programa BIOEDIT 7.1.3 (HALL, 1999) utilizando o programa CLUSTAL-W (THOMPSON *et al.*, 1994), os haplótipos existentes foram identificados e os *indels* de mesma dimensão e localização foram considerados como um único sítio polimórfico. As sequências das três regiões amplificadas foram concatenadas utilizando o programa MESQUITE (MEDDISON, 2011). A partir do programa DNA<sub>SP</sub> (ROZAS *et al.*, 2003) foi realizada uma análise de diversidade nucleotídica. As relações existentes entre os haplótipos foi estimada a partir de uma rede de haplótipos construída com o método de parcimônia estatística com limite de 95% pelo programa TCS 1.21 (CLEMENT *et al.*, 2000).

### 3.3 LOCOS DE DNA MICROSSATÉLITE

Cada indivíduo na amostra foi genotipado para 10 locos de DNA microsatélite previamente descritos para a espécie *P. machrisii* por Perez *et al.* (2011). A amplificação desses locos foi testada com sucesso em outras espécies do grupo *P. AURISSETUS* por Moraes *et al.* (2012), incluindo *P. jauruensis*.

As reações foram realizadas em um volume de 10µL para os locos *Pmac82*, *Pmac84*, *Pmac128* e *Pmac130*, os quais foram genotipados por eletroforese capilar em um sequenciador *ABI PRISM 3730 DNA Analyzer* (Applied Biosystems) utilizando *LIZ 500* (Applied Biosystems) como padrão de tamanho. Essa análise foi realizada pelo serviço de sequenciamento do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) do campus Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista. As genotipagens foram analisadas com o programa *GeneMarker* v1.91 (SoftGenetics, Figura 5).

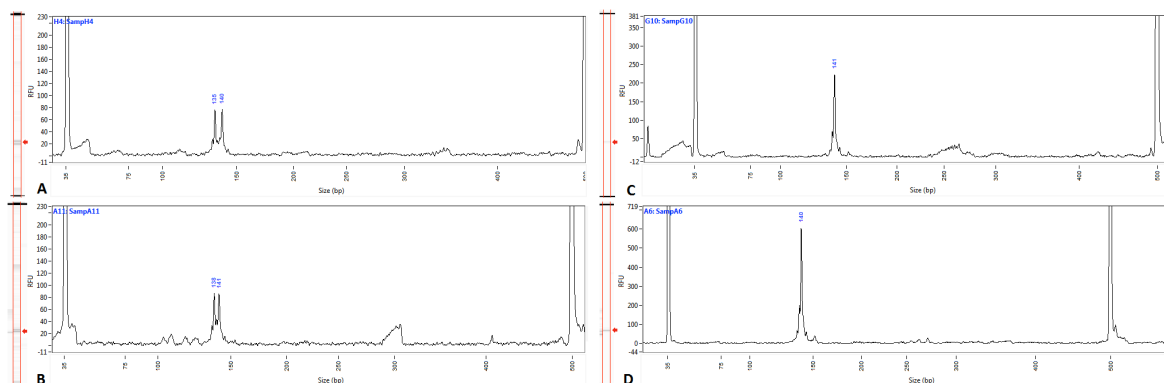
**FIGURA 5** - Exemplos de eletroferogramas analisados com o programa *GeneMarker* v1.91.



Fonte: Elaborado pela autora. A e B representam genótipos homozigotos e C e D genótipos heterozigotos.

Para os locos restantes, as reações foram realizadas num volume de 20 $\mu$ L e os produtos de PCR analisados em sistema de eletroforese capilar (Fragment Analyzer™ Automated CE System), o qual estima o tamanho dos fragmentos na amostra a partir do sinal fluorescente de um corante intercalante de ácidos nucleicos e um padrão de peso molecular. O genótipo de cada loco em cada indivíduo foi obtido a partir dos dados gerados na eletroforese capilar usando o programa *PROsize* (Advanced Analytical, Figura 6).

**FIGURA 6** - Exemplos de eletroferogramas analisados com o programa *PROsize*.



Fonte: Elaborado pela autora. A e B representam genótipos heterozigotos e C e D genótipos homozigotos.

Para os locos *Pmac82*, *Pmac84*, *Pmac85*, *Pmac108*, *Pmac128*, *Pmac130* e *Pmac146*, foram utilizadas nas reações de PCR 1  $\mu$ L de DNA (0,5-10ng/ $\mu$ L), 1X de tampão padrão para PCR (Promega), 0,2 mM de cada dNTP, 0,25  $\mu$ M de cada iniciador, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Promega) e 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>. Para o loco *Pmac135* foram utilizados 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub> e para os locos *Pmac102* e *Pmac149* utilizou-se 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub>. As condições físicas empregadas para todos os locos foram 94°C por 2 minutos; 35x (94°C por 40 segundos, temperatura de hibridização específica por 40 segundos, 72°C por 40 segundos); 72°C por 10 minutos. As temperaturas específicas de anelamento para cada iniciador estão apresentadas na Tabela 2.

**TABELA 2** - Relação dos 10 locos de DNA microsatelite utilizados para as genotipagens em *Pilosocereus jauruensis*. Sequências dos iniciadores *forward* (F) e *reverse* (R), unidades repetitivas e temperaturas de anelamento (*Ta*).

Locos	Unidade Repetitiva	Sequência do iniciador (5' - 3')	<i>Ta</i> (°C)
<i>Pmac082</i>	(GAG) <sub>5</sub> (GAA) <sub>2</sub> (GAG) <sub>2</sub> GAA	F:GTAAAAGAGGAGGATGGAGAGG	56
<i>Pmac084</i>	(GAG) <sub>5</sub> (AG) <sub>9</sub> CG(AG) <sub>2</sub>	R: CTTCTTCTTGCTAGGTTTCTCG F: CATAAATTGCAGAAATGAGGAC	52
<i>Pmac085</i>	(AG) <sub>6</sub> AC(AG) <sub>3</sub> AC (AG) <sub>4</sub>	R: AGGTAAACCGCTAACTCGATG F: CCCCTCACTTCTCCAATCTC	54
<i>Pmac102</i>	(AG) <sub>9</sub>	R: TCCCTCCTTCTTTTGTGTTC F: TCTATAAGTGCCGATGGATGC	60
<i>Pmac108</i>	(AG) <sub>14</sub> (TG) <sub>7</sub>	R: CACACCTCACTCCCAACCTC F: TGAATGTCTGCCATTAGAAAGC	52
<i>Pmac128</i>	(TC) <sub>5</sub> TT(TC) <sub>10</sub> (AC) <sub>10</sub>	R: TAATCGCCCCAAAGAAGAAC F: GTGTTGATTGTACTCTTCAG	60
<i>Pmac130</i>	(AG) <sub>7</sub> CA(AG) <sub>12</sub>	R: CTAACCCTTTGTATACATGC F: GAGGTGCCAATAAATCG	54
<i>Pmac135</i>	(TC) <sub>5</sub> TG(TC) <sub>12</sub>	R: TGTCACGCAATCTTGAACC F: ACCAGAATGAGCTCAGCTGTAG	52
<i>Pmac146</i>	(AG) <sub>20</sub>	R: CCTAGCTAGCAGAATCAGAGTG F: ACCCGACATCCCCTTGTAG	62
<i>Pmac149</i>	(TC) <sub>19</sub>	R: TAGTCTGAAACGGAGCAAGG F: TTCATCCTGCTTTTGAAGTTTG	62
		R: TGATGGATTAGGATTGACCTG	

Fonte: Moraes *et al.* (2012).

### 3.4 ANÁLISE DOS DADOS SSR

#### 3.4.1 Validação dos dados genotípicos

Possíveis erros de genotipagem devido a presença de alelos nulos, dominância de alelos curtos (*allele drop-out*) ou bandas *stutter*, possivelmente causados por degradação ou baixas concentrações de DNA, assim como por mutações no sítio de ancoragem dos iniciadores, foram checados com o programa Micro-Checker 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004). Para os locos nos quais foi detectada a possível presença de alelos nulos, foi realizada a correção das frequências alélicas utilizando o programa FREENA (CHAPUIS; ESTOUP, 2007). O método ENA realizado pelo programa FREENA foi utilizado para corrigir a possível superestimativa de  $F_{ST}$  induzida

por alelos nulos. A ocorrência de desequilíbrio de ligação entre pares de locos foi analisada com um teste de verossimilhança implementado no programa ARLEQUIN 3.0 (EXCOFFIER *et al.*, 2005). A fim de evitar erros estatísticos do tipo I, resultante de múltiplos testes, foi realizada a correção sequencial de Bonferroni (RICE, 1979) sobre os valores de  $P$  obtidos de forma independente para os 45 testes de cada população.

### **3.4.2 Diversidade Genética**

Os parâmetros de diversidade genética: número de alelos por loco ( $A$ ), riqueza alélica ( $A_R$ ), heterozigosidades observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ), foram estimados utilizando o programa GENEALEX 6.5 (PEAKALL E SMOUSE, 2012). Foram também realizados teste de desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) através de um teste exato com cadeia de Markov e estimado o coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ), o qual quantifica o desvio de heterozigotos em relação ao esperado pelo EHW ou a correlação entre os alelos dos indivíduos em relação à população que eles pertencem (HOLSINGER e WEIR, 2009) utilizando o programa FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET 1995). A correção sequencial de Bonferroni (RICE, 1979) foi aplicada sobre os valores de  $P$  dos testes de EHW, e valores de  $F_{IS}$  por locos.

### **3.4.3 Estrutura Genética Populacional**

O nível de diferenciação populacional foi avaliado através do índice de fixação  $F_{ST}$ , calculado com o estimador  $\theta$  (WEIR; COCKERHAM, 1984). Embora a estatística  $F_{ST}$  seja amplamente usada para estimar o nível de estrutura genética em um conjunto de subpopulações, recentemente têm sido destacado algumas limitações desse parâmetro para análise de marcadores altamente variáveis (CHARLESWORTH, 1998), sugerindo a adoção de outras estatísticas não-enviesadas, como  $D$  (JOST, 2008) e  $G''_{ST}$  (MEIRMANS; HEDRICK, 2011). A principal limitação apontada nesses trabalhos se refere à dependência do  $F_{ST}$  em relação ao nível de diversidade genética média dentro das populações ( $H_S$ ), causando subestimativa desse parâmetro. Dessa forma, o nível de estrutura populacional em *P. jauruensis* também foi avaliado através do parâmetro  $G''_{ST}$  (MEIRMANS; HEDRICK, 2011). Este parâmetro, além de não ser influenciado pelo  $H_S$  e incorporar uma correção para o número reduzido de populações na amostra, parece ser mais sensível aos processos demográficos (p. ex. deriva genética e migração) que governam a estrutura populacional em comparação com o parâmetro  $D$  de Jost (2008). No entanto, deve ser enfatizado que nenhuma dessas medidas é completamente eficiente

para refletir todas as causas e consequências da estrutura genética de um conjunto de populações (MEIRMANS; HEDRICK, 2011; WHITLOCK, 2011). Todas as estimativas de estruturação genética foram realizadas pelo programa GENEALOX 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012).

A estrutura populacional em *P. jauruensis* foi analisada também a partir de uma análise *bayesiana* implementada no programa STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD *et al.*, 2000). Esta análise infere o número mais provável de grupos de indivíduos intercruzantes na amostra total (população genética;  $K$ ) e a proporção do genótipo multilocos de cada indivíduo ( $q$ ) pertencente a cada um desses grupos. O delineamento dos grupos realizado pelo método de Pritchard *et al.* (2000) é conduzido descartando a informação sobre a localização geográfica dos indivíduos e com base apenas em seus genótipos multilocos, buscando minimizar os desequilíbrios de ligação e de Hardy-Weinberg tanto quanto possível. Quando o programa é informado sobre a procedência de cada indivíduo (população local de origem do indivíduo) essa análise também permite inferir a presença de possíveis imigrantes de outras populações amostradas com base na probabilidade posterior do genótipo multilocos do indivíduo pertencer a cada uma das populações analisadas.

A quantidade mais provável de grupos genéticos ( $K$ ) foi estimada a partir do resultado de dez simulações simultâneas independentes, permutados com o programa CLUMPP (JAKOBSSON; ROSENBERG, 2007). Para cada simulação, foram realizadas 1.000.000 interações, sendo as 100.000 interações iniciais descartadas (burn-in), e o número de grupos variando de 1 a 1 + número de populações. Foi utilizado o modelo que não admite mistura de genótipos entre as populações, assumindo que o fluxo gênico atual é baixo entre as diferentes populações e frequências alélicas correlacionadas, admitindo que essas populações possuem tempo de divergência recente. Essa análise foi realizada primeiramente para as populações de *P. jauruensis* e *P. vilaboensis* em conjunto a fim de investigar uma possível incongruência taxonômica envolvendo as populações das duas espécies. Em uma segunda análise foram analisadas apenas as populações de *P. jauruensis*. A proporção dos genomas individuais ( $Q$ ) nas populações pertencente a cada grupo genético identificado foi representado geograficamente com o auxílio do programa R 3.1.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011) utilizando os dados obtidos pelo programa CLUMPP (JAKOBSSON; ROSENBERG, 2007) e plotados sobre o mapa de distribuição das populações.

Os grupos de indivíduos inferidos pelo STRUCTURE foram submetidos a uma análise de variância molecular (AMOVA) hierárquica, com o auxílio do programa ARLEQUIN 3.0 (EXCOFFIER *et al.*, 2005). Essa análise quantifica a distribuição da variação genética entre grupos de indivíduos (populações) e também entre regiões geográficas abrangendo grupos de populações.

#### **3.4.4 Correlação Genética e Geográfica (Teste de Mantel)**

A correlação entre distâncias geográficas e genéticas foi estimada a partir de um teste de Mantel (MANTEL, 1967). As distâncias genéticas foram estimadas pelo parâmetro  $G''_{ST}$  para cada um dos pares de população. Primeiramente a análise foi realizada com todo o conjunto de populações de *P. jauruensis* e posteriormente incluindo as populações de *P. vilaboensis*. Todas as estimativas para o teste de Mantel foram realizadas com o programa GENEALEX 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012).

#### **3.4.5 Detecção de Migrantes**

A presença de indivíduos migrantes nas populações analisadas foi inferida a partir do método *bayesiano* implementado no programa STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD *et al.*, 2000). As informações geográficas foram incorporadas nas análises e o número de grupos foi fixado de acordo com o número de populações analisadas. Essa análise identifica migrantes a partir do estabelecimento de uma probabilidade mínima (0,5) do genótipo de um determinado indivíduo pertencer à população onde este foi amostrado. Indivíduos com valores abaixo desse valor de corte são considerados migrantes ou descendentes de migrantes e a provável população-fonte é determinada pelo maior valor de probabilidade do genótipo desse indivíduo entre as populações amostradas.

Também foi realizada a inferência de indivíduos migrantes através da análise *bayesiana* parcial proposta por Cornuet *et al.* (1999) e implementada no programa GENECLASS2 (PIRY *et al.*, 2004). Embora este método apresente menor resolução comparado ao método implementado pelo programa STRUCTURE (MANEL *et al.*, 2002), ele possui a propriedade de considerar a possibilidade que nem todas as populações foram necessariamente amostradas, permitindo que possíveis migrantes sejam classificados como pertencentes a populações não amostradas na análise (MANEL *et al.*, 2002).

A análise a partir do programa GENECLASS2 foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa foi estimada a probabilidade de um indivíduo ser migrante de uma

população não amostrada, considerando a incerteza de todas as populações fonte de migrantes estarem na análise, através dos valores de verossimilhança ( $L_{home}$ ) de um determinado indivíduo pertencer a população onde foi amostrado (PAETKAU *et al.*, 2004; PIRY *et al.*, 2004). A segunda etapa consiste em verificar a probabilidade de um indivíduo ser migrante de uma população amostrada e é estimada pela razão entre a verossimilhança de um indivíduo pertencer a população onde foi amostrado e o valor máximo de verossimilhança desse indivíduo entre as populações amostradas ( $L_{home}/L_{max}$ ). Para a realização de ambas análises foi utilizado o critério *bayesiano* definido por Rannala e Mountain (1997) e o método de Paetkau *et al.* (2004) a partir de 10.000 reamostragens com o parâmetro *alpha*, que determina a probabilidade de ocorrência de erros do tipo I, fixado em 0,01.

#### **3.4.6 Gargalos Populacionais (Bottleneck)**

A ocorrência de gargalos populacionais drásticos e recentes nas populações de *P. jauruensis* foi investigado com o programa BOTTLENECK 1.2.03 (PIRY *et al.*, 1999). Essa análise é fundamentada na expectativa que populações que sofreram reduções drásticas de tamanho devem perder relativamente mais diversidade alélica que heterozigosidade durante este evento demográfico (CORNUET; LUIKART, 1996). Seguindo essa expectativa, o programa BOTTLENECK testa se há um excesso de heterozigosidade na população em relação a sua diversidade alélica, revelando a ocorrência de possíveis gargalos populacionais. A análise foi realizada usando o modelo de mutação TPM (*Two Phase Model*) que contempla de maneira proporcional os modelos IAM (*Infinite Alleles Model*) (KIMURA; CROW, 1964) e SMM (*Stepwise Mutation Model*). A significância estatística dos resultados foi determinada usando o teste de Wilcoxon (Wilcoxon signed rank test), pois este teste é robusto para os efeitos de tamanho amostral pequeno e reduzido número de locos (PIRY *et al.*, 1999).

#### **3.4.7 Relações de Similaridade Genética entre Populações**

As relações de similaridade genética entre as populações de *P. jauruensis* e *P. vilaboensis* foram acessadas através da construção de árvores Neighbour-Joining (SAITOU; NEI, 1987) usando as medidas de diferenciação genética par a par  $F_{ST}$  ( $\theta$ ) (WEIR; COCKERHAM, 1984),  $D_C$  (chord distance) (CAVALLI-SFORZA; EDWARDS, 1967) e  $D$  (JOST, 2008). A distância  $D_C$  é apropriada para locos microsatélites com diferentes taxas de evolução pois é livre da influência causada por

essas diferenças, dando ênfase apenas ao número e frequência de alelos compartilhados entre populações (CHAPUIS; ESTOUP, 2007). A estimativa da estatística  $D$  (JOST, 2008) não é influenciada por diferenças nos tamanhos populacionais, sendo determinada apenas pela taxa de migração, número de populações e taxa de mutação nos locos (MEIRMANS; HEDRICK, 2011). Embora essa característica torne a estatística  $D$  menos adequada para descrever a influência de eventos demográficos sobre a estrutura populacional, ela descreve com bastante eficiência a diferenciação alélica entre as populações (JOST, 2009; MEIRMANS; HEDRICK, 2011).

Os valores de  $F_{ST}$  e  $D$  par a par foram obtidos pelo programa GENEALEX 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012) utilizando 999 permutações. Os valores de  $D_C$  foram obtidos pelo programa POPULATIONS (LANGELLA, 1999) utilizando 400 permutações. A construção de todas as árvores Neighbour-Joining foi realizada com o programa POPULATIONS (LANGELLA, 1999), com a consistência dos ramos estimada a partir de 1.000 interações (*bootstrap*).



## 4. RESULTADOS

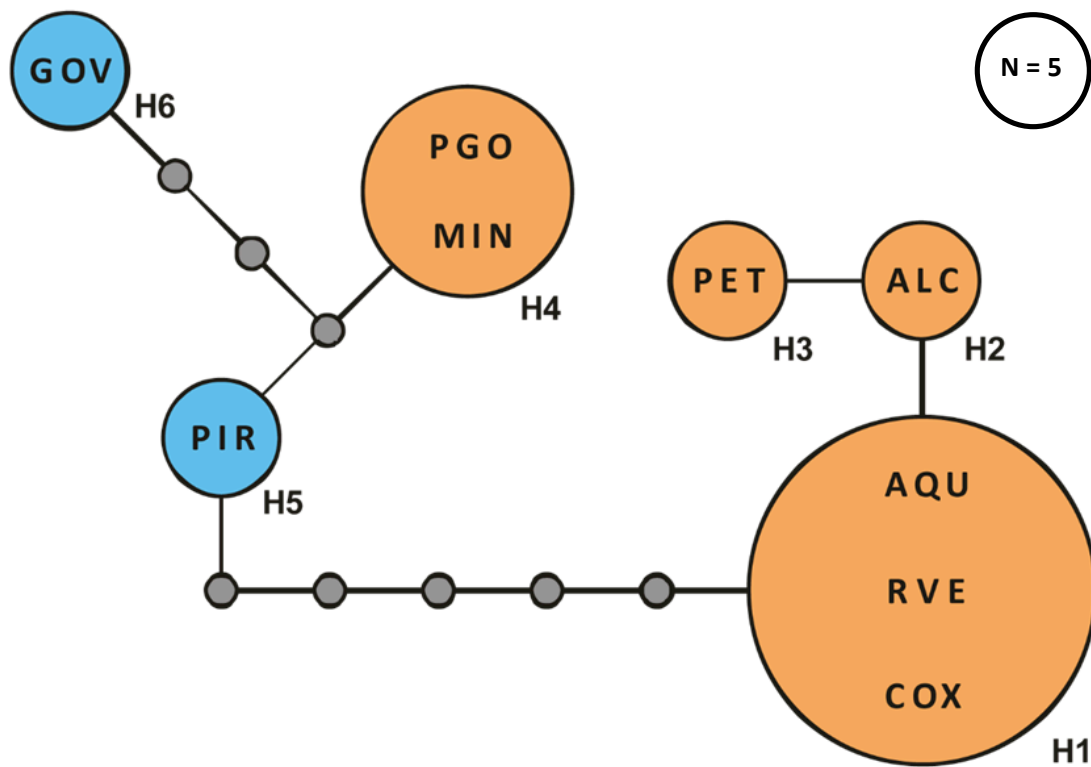
### 4.1 ANÁLISE DA VARIAÇÃO EM *cpDNA*

Foram analisados um total de 1601 pares de base, sendo 331pb do espaçador *trnTtrnL* e 1290pb do espaçador *trnS<sup>GCU</sup>-trnG<sup>UCC</sup>* (550pb da porção 3'*trnS-trnG* e 740pb da porção 5'*trnS-trnG*). Para a espécie *P. jauruensis* foram analisadas 34 sequências (cinco indivíduos de cada população, exceto PGO com quatro indivíduos), enquanto que para a espécie *P. vilaboensis* foram analisadas 10 sequências (cinco indivíduos de cada população).

A análise da variação nos segmentos concatenados dos 44 indivíduos revelou 13 sítios polimórficos, sendo quatro *indels* e nove substituições, resultando em seis haplótipos distintos (H1 – H6, Figura 5). Apenas um único haplótipo foi observado em cada população. O índice de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) foi de 0,0014 ( $\pm$  0,00024) quando analisadas apenas as sequências das populações de *P. jauruensis* e 0,0020 ( $\pm$  0,00016) quando foram incluídas na análise as sequências das populações de *P. vilaboensis*.

O haplótipo H1 foi compartilhado pelas populações de *P. jauruensis* AQU, RVE e COX, enquanto o haplótipo H4 foi compartilhado pelas populações PGO e MIN. Esse último haplótipo está proximamente relacionado com os haplótipos observados nas populações PIR e GOV de *P. vilaboensis* (H5 e H6) e distante cinco passos mutacionais do haplótipo H1 (Figura 7). Essas relações estabeleceram dois haplogrupos na rede, um compreendendo as populações de *P. jauruensis* encontradas nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul e outro compreendendo as populações de *P. vilaboensis* e as populações de *P. jauruensis* no estado de Goiás.

**FIGURA 7** - Rede de haplótipos das regiões concatenadas *trnS<sup>GCU</sup>-trnG<sup>UCC</sup>* e *trnT-trnL*.



Fonte: Elaborado pela autora. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos com cada haplótipo. Os círculos em cinza representam haplótipos não amostrados, os círculos em laranja representam haplótipos amostrados em populações de *P. jauruensis* e os círculos em azul em populações de *P. vilaboensis*.

#### 4.2 GENOTIPAGEM DOS LOCOS DE DNA MICROSSATÉLITE

Este projeto abrange a genotipagem de 10 locos em uma amostra total de 157 indivíduos da espécie *P. jauruensis*, o que caracteriza um total de 1570 genótipos. Alguns desses genótipos falharam na genotipagem, resultando em um total de 52 genótipos faltantes, o que representa 3,3% do total. A tabela 3 apresenta a relação do número e porcentagem relativa de genótipos faltantes para cada loco e população.

**TABELA 3** - Informações sobre dados genotípicos faltantes de acordo com o loco e a população específica.

Loco	População	N.º de genótipos faltantes / % relativa
<i>Pmac82</i>	RVE	4 / 20
	MIN	4 / 12
<i>Pmac108</i>	PGO	3 / 15
<i>Pmac128</i>	PET	3 / 10
	PGO	6 / 30
<i>Pmac135</i>	AQU	13 / 39
	COX	1 / 7
	MIN	3 / 9
<i>Pmac146</i>	RVE	2 / 10
	COX	1 / 7
	MIN	4 / 12
	PGO	3 / 15
<i>Pmac149</i>	RVE	3 / 15
	ALC	1 / 12
	COX	1 / 7

Fonte: Elaborado pela autora.

De acordo com esse resultado o loco *Pmac135* apresentou o maior número de genótipos faltantes, 17, sendo que 13 ocorreram na população de AQU. Esse resultado pode indicar um possível alteração na região flaqueadora do microsatélite desse loco para essa população em relação a espécie relacionada *P. macrhisii* para a qual esses marcadores foram desenvolvidos.

O loco *Pmac82* apresentou 8 genótipos faltantes e os locos *Pmac108*, *Pmac128*, *Pmac146* e *Pmac149* apresentaram 3, 9, 10 e 2 genótipos faltantes, respectivamente. A população com maior número de genótipos faltantes foi AQU com 13, seguida pelas populações PGO, MIN e RVE que apresentaram 12, 11 e 9 respectivamente. As populações COX e PET apresentaram 3 genótipos faltantes cada e a população ALC apresentou apenas 1.

Os diferentes alelos de locos microssatélites foram identificados por diferenças no tamanho de produtos de PCR. Embora seja assumido que alelos do mesmo tamanho são idênticos por origem, é importante considerar a possível ocorrência de homoplasia de tamanho (i.e. alelos idênticos por estado, mas não por origem). Contudo, pelo fato do nível de homoplasia de tamanho ser dependente do tempo de divergência entre os táxons e seu efeito nas estimativas de parâmetros populacionais ser compensado pela quantidade de variação nos locos microssatélites (ESTOUP *et al.*, 2002), essa homoplasia possivelmente não representa um problema significativo para as populações em estudo.

### **4.3 ANÁLISES DOS DADOS SSR**

#### **4.3.1 Validação dos genótipos obtidos**

A ocorrência de alelos nulos e erros de genotipagem (*allele drop-out* e *stutter bands*) nos genótipos obtidos para os indivíduos de *P. jauruensis* foi verificada com o programa MICRO-CHECKER (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004). Esta análise apontou a presença de alelos nulos em elevadas frequências nos locos *Pmac84* (25%), *Pmac146* (25%), *Pmac135* (22%), *Pmac108* (16%), *Pmac85* (15%) e *Pmac149* (13%) em todas as populações analisadas de acordo com a estimativa de Van Oosterhout *et al.* (2004). A presença de uma elevada frequência de alelos nulos provavelmente é resultado desses marcadores microssatélites serem heterólogos, desenvolvidos para a espécie relacionada *P. machrisii* e posteriormente transferidos para a espécie *P. jauruensis*.

Em função da presença de alelos nulos, foi realizada a estimativa ENA das frequências alélicas a partir do programa FREENA (CHAPUIS; ESTOUP, 2007). Essa estimativa realiza simulações para investigar a prevalência e a distribuição de diferentes tamanhos de alelos nulos em locos microssatélites, permitindo a correção da estimativa de  $F_{ST}$ . O índice  $F_{ST}$  por loco e total após a correção apresentou valores que se enquadravam dentro do IC 95% dos valores não corrigidos, indicando que a diferença das duas estimativas não é estatisticamente significativa. Portanto, é possível concluir que a presença de alelos nulos não causou desvios na estimativa do parâmetro  $F_{ST}$ .

Não foi observado resultados significativos ( $\alpha=0,05$ ) para desequilíbrio de ligação entre os locos analisados após a correção sequencial de Bonferroni (RICE, 1989) em um total de 45 testes para cada uma das populações em *P. jauruensis*.

#### 4.2.2 Diversidade Genética

As análises de diversidade genética realizadas (Tabela 4) mostraram que o número médio de alelos ( $n_A$ ) variou de 3,7 (população ALC) a 7,0 (PET) com média de 5,3 alelos. A heterozigotidade média observada ( $H_O$ ) por população variou de 0,253 (RVE) a 0,409 (MIN), com  $H_O$  média para a espécie de 0,343. A heterozigotidade média esperada ( $H_E$ ) por população variou entre 0,567 (AQU) a 0,738 (PET), com  $H_E$  média para a espécie de 0,648 (os valores obtidos por loco estão disponíveis em ANEXO 4). Esses resultados estão dentro da série de valores de diversidade genética para os mesmo locos microssatélites encontrada por Moraes *et al.* (2012) em outras espécies de do grupo *P. AURISSETUS*. A riqueza alélica ( $A_R$ ) variou entre 3,4 para a população AQU a 4,9 para a população PET.

**TABELA 4.** Índices de diversidade genética para 10 locos microssatélites de sete populações de *P. jauruensis*.

Loco	$n_G$	$n_A$	$A_R$	$H_O/H_E$	$F_{IS}$
AQU	31,6	4,7	3,4	0,400/0,567	0,302
RVE	18,9	4,9	3,7	0,253/0,585	0,575*
ALC	7,9	3,7	3,6	0,275/0,604	0,563*
COX	12,7	4,8	4,0	0,392/0,630	0,389*
PET	29,5	7,0	4,9	0,280/0,738	0,624*
MIN	30,7	6,5	4,6	0,409/0,681	0,404*
PGO	18,6	6,1	4,6	0,391/0,732	0,473*

Fonte: Elaborado pela autora. Sendo:  $n_G$ , número de genótipos;  $n_A$ , número de alelos;  $A_R$ , riqueza alélica;  $H_O$ , Heterozigotidade observada;  $H_E$ , Heterozigotidade esperada; \*, valores significativos de  $F_{IS}$  após a correção de Bonferroni.

Todas as populações analisadas mostraram deficiência significativa de heterozigotos para um a 10 locos. A população COX apresentou desvios do EHW em apenas um loco, as populações AQU e ALC apresentaram desvios para três locos, a população MIN apresentou desvio em sete locos, a população RVE apresentou desvio em oito locos e as populações PET e PGO apresentaram desvios do EHW para todos os locos analisados.

Após a correção de Bonferroni, as estimativas de  $F_{IS}$  (Tabela 4) resultaram em valores significativos para três a seis locos nas populações AQU, RVE, ALC e COX, e

para todos os locos na população PET. Com exceção da população AQU, o valor médio de  $F_{IS}$  foi significativo em todas as populações analisadas. Embora a correção nas frequências alélicas realizadas com o programa FREENA tenha mostrado que a presença de alelos nulos não causou desvios significativos na estimativa de  $F_{ST}$ , a presença desses alelos deve ter contribuído para a deficiência de heterozigotos nos locos *Pmac84*, *Pmac85*, *Pmac108*, *Pmac135*, *Pmac146* e *Pmac149*, enquanto que os desvios nos outros locos provavelmente são resultado apenas de endogamia nestas populações.

A população PET apresentou valores de  $F_{IS}$  significativos para todos os locos. Dado que a amostragem dessa população foi realizada em duas áreas próximas porém separadas por um vale entre as áreas montanhosas, uma provável subestruturação dessa população deve ter causado efeito Wahlund, resultando nesse grande número de resultados significativos.

#### 4.3.3 Estruturação Genética

A Tabela 5 apresenta a estimativa dos parâmetros de estruturação genética  $F_{ST}$  e  $G''_{ST}$ . Os valores do índice de fixação  $F_{ST}$  total para as seis populações de *P. jauruensis* obtidos pelo estimador  $\theta$  foi de 0,201 e as estimativas por loco variaram entre 0,073 (*Pmac135*) a 0,340 (*Pmac82*). A estimativa do índice de fixação  $G''_{ST}$  resultou em um valor médio de 0,559 e variou entre 0,140 (*Pmac135*) a 0,686 (*Pmac128*). O índice de fixação  $G''_{ST}$  é uma correção para o número de amostras populacionais do índice  $G'_{ST}$  (HEDRICK, 2005) e não é dependente do nível de diversidade genética média dentro das populações como o  $F_{ST}$ . Os resultados obtidos indicam uma elevada estruturação genética nas populações de *P. jauruensis*.

Alelos exclusivos com elevada frequência (frequência a cima de 10%) foram observados em quatro das sete populações estudadas. A população de ALC apresentou dois desses alelos (locos *Pmac82* e *Pmac85*) e as populações PET, MIN e PGO um alelo cada (locos *Pmac82*, *Pmac85* e *Pmac128* respectivamente).

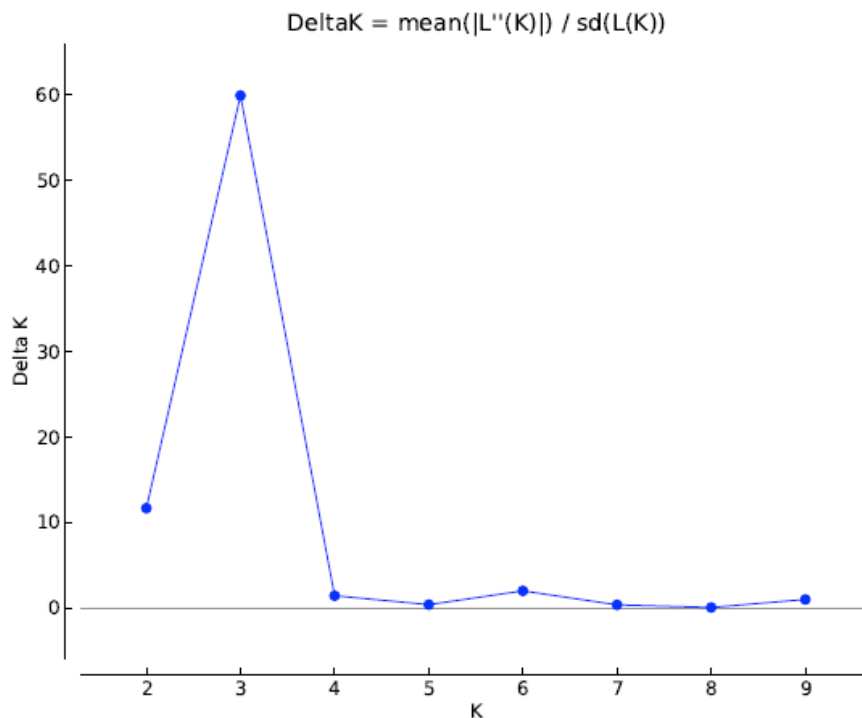
**TABELA 5.** Valores de  $F_{ST}$  estimados sobre os dados originais e corrigidos com a estimativa ENA para os locos que indicaram a presença de alelos nulos e estimativa de  $G''_{ST}$  por loco e seus respectivos valores de  $P$ .

	$F_{ST}$ com ENA	$F_{ST}$	$P$	$G''_{ST}$	$P$
<i>Pmac82</i>	-	0,340 (IC95% 0,171-0,418)	0,001	0,662	0,001
<i>Pmac84</i>	0,183	0,234 (IC95% 0,105-0,344)	0,001	0,512	0,001
<i>Pmac85</i>	0,090	0,122 (IC95% 0,040-0,252)	0,001	0,534	0,001
<i>Pmac102</i>	-	0,310 (IC95% 0,183-0,366)	0,001	0,711	0,001
<i>Pmac108</i>	0,119	0,132 (IC95% 0,036-0,215)	0,001	0,508	0,001
<i>Pmac128</i>	-	0,234 (IC95% 0,136-0,413)	0,001	0,686	0,001
<i>Pmac130</i>	-	0,224 (IC95% 0,117-0,300)	0,001	0,599	0,001
<i>Pmac135</i>	0,041	0,073 (IC95% 0,004-0,135)	0,081	0,140	0,078
<i>Pmac146</i>	0,123	0,148 (IC95% 0,082-0,227)	0,003	0,435	0,003
<i>Pmac149</i>	0,163	0,222 (IC95% 0,143-0,260)	0,001	0,662	0,001
Total	0,170 (IC95% 0,126-0,216)	0,201 (IC95% 0,159-0,245)	0,001	0,559	0,001

Fonte: Elaborado pela autora.

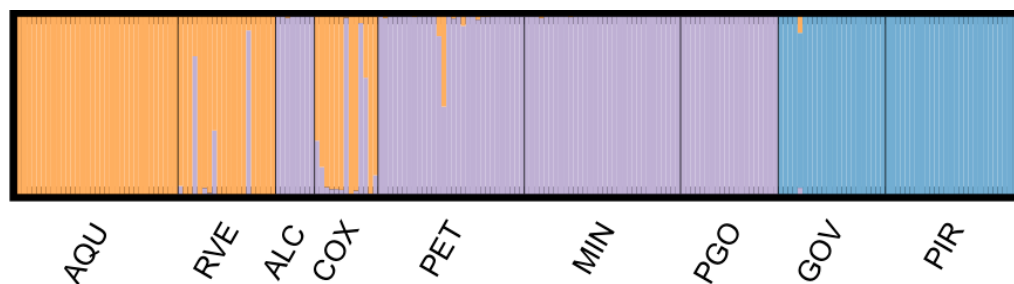
A análise *bayesiana* implementada pelo programa STRUCTURE revelou a existência de dois grupos genéticos abrangendo as populações de *P. jauruensis* e um grupo distinto envolvendo as populações de *P. vilaboensis* ( $K=3$ , Figura 8). Um desses grupos foi formado pelas populações na distribuição mais ao sul de *P. jauruensis* do estado de Mato Grosso do Sul (AQU, RVE e COX; Grupo Sul), enquanto um segundo grupo foi formado pelas populações encontradas ao norte da distribuição conhecida dessa espécie, (ALC, PET, MIN e PGO; Grupo Norte ). Um terceiro grupo foi composto pelas duas populações analisadas de *P. vilaboensis* (Figura 9).

**FIGURA 8** - Representação gráfica da análise de identificação do valor mais provável de  $K$  para todas as populações de *P. jauruensis* e *P. vilaboensis*.



Fonte: Elaborado pela autora. Análise realizada a partir da estatística  $\Delta K$  (EVANNO *et al.*, 2005).

**FIGURA 9** - Resultado da análise Bayesiana implementada pelo programa STRUCTURE para todas as populações de *P. jauruensis* e *P. vilaboensis*



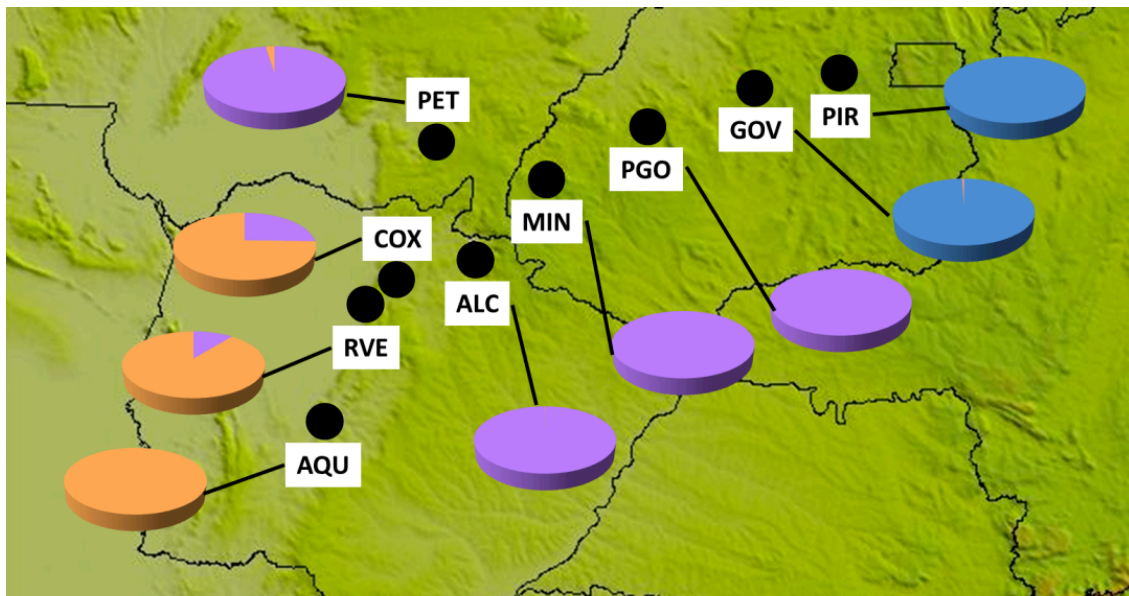
Fonte: Elaborado pela autora. Cada indivíduo é representado por uma barra vertical, apresentando a proporção de seu genoma pertencente a cada um dos grupos estabelecidos. Linhas pretas separam os indivíduos de diferentes populações.

A Figura 10 apresenta a proporção média dos genomas individuais em cada população pertencente a cada grupo genético revelado pelo programa STRUCTURE. Esse resultado mostra que a estrutura populacional está associada com a proximidade



geográfica das populações, concordando com os resultados de associação significativa entre as distâncias genética e geográfica obtidos pelo Teste de Mantel (ver abaixo).

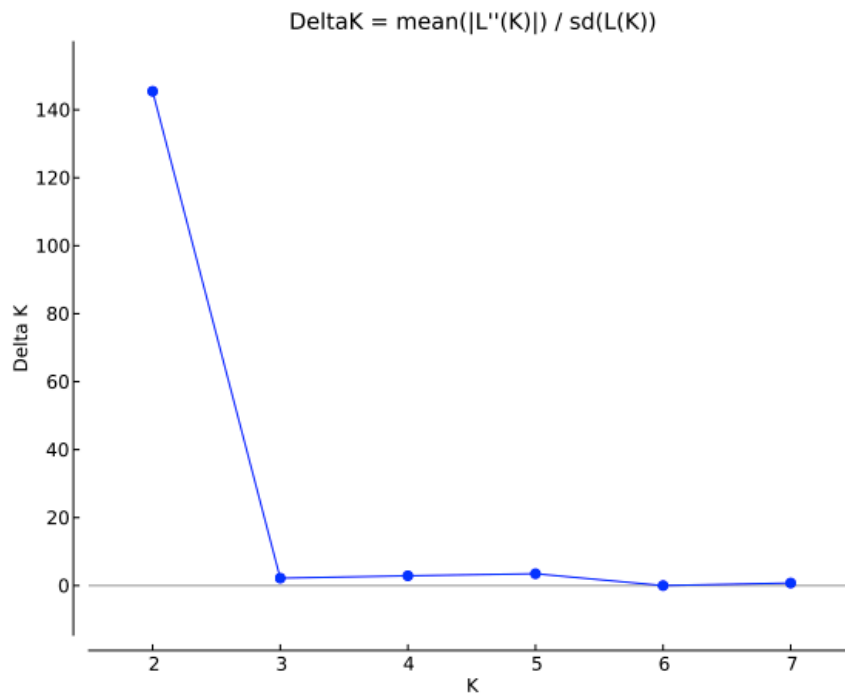
**FIGURA 10** - Representação geográfica da proporção média dos genomas individuais em cada população pertencente a cada grupo genético revelado pelo programa STRUCTURE.



Fonte: Elaborado pela autora.

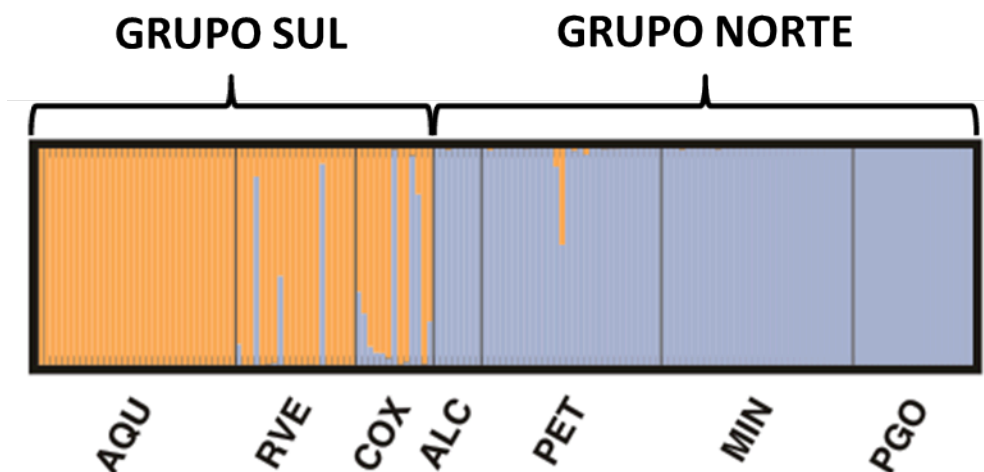
A análise com o programa STRUCTURE realizada somente com os genótipos da espécie *P. jauruensis* confirmou a existência de dois grupos genéticos distintos, associados com as distribuições norte e sul da espécie (Figuras 11 e 12). Para verificar que a identificação de grupos genéticos na amostra não foi influenciada pelo uso de dois métodos diferentes de genotipagem, 5% das amostras genotipadas pelo sequenciador *ABI PRISM 3730 DNA Analyzer* (Applied Biosystems) tiveram seus genótipos confirmados pela genotipagem no equipamento *Fragment Analyzer™ Automated CE System*. Além disso, foi feita uma análise no programa STRUCTURE utilizando apenas os seis locos genotipados pelo método implementado pelo *Fragment Analyzer™ Automated CE System* e a formação dos mesmos dois grupos foi obtida (resultados não mostrados).

**FIGURA 11** - Representação gráfica da análise de identificação do valor mais provável de  $K$  para as populações de *P. jauruensis*.



Fonte: Elaborado pela autora. Análise realizada a partir da estatística  $\Delta K$  (EVANNO *et al.*, 2005).

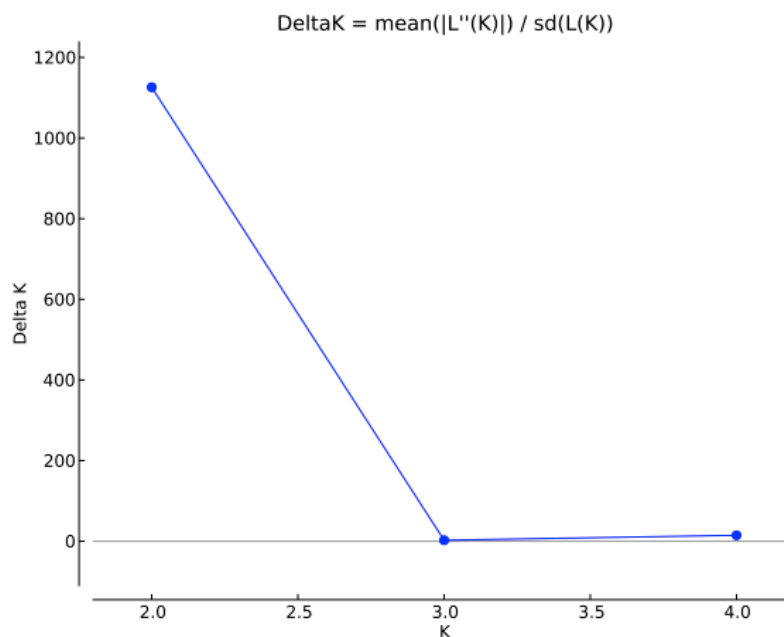
**FIGURA 12** - Resultado da análise Bayesiana implementada pelo programa STRUCTURE, somente para as populações de *P. jauruensis*.



Fonte: Elaborado pela autora. Cada indivíduo é representado por uma barra vertical, apresentando a proporção de seu genoma pertencente a cada um dos grupos estabelecidos. Linhas pretas separam os indivíduos de diferentes populações.

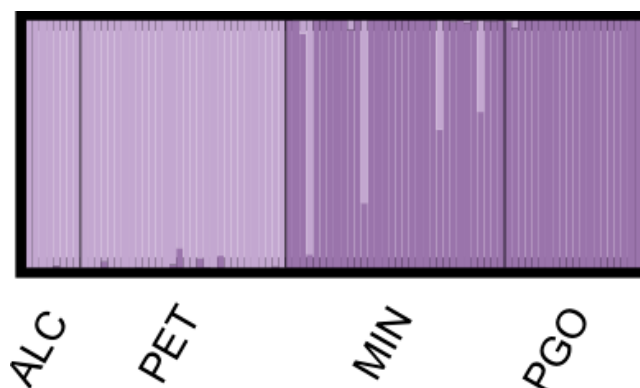
Uma nova análise foi feita pelo programa STRUCTURE utilizando apenas as populações do Grupo Norte para identificar possíveis agrupamentos dentro desse grupo. Essa nova análise apontou dois subgrupos ( $K=2$ , Figura 13), um reunindo as populações ALC e PET (Subgrupo NW), a oeste da distribuição do grupo nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, e outro reunindo as populações MIN e PGO (Subgrupo NE), a leste da distribuição do grupo no estado de Goiás (Figura 14). A distribuição geográfica desses dois agrupamentos corresponde, respectivamente, às regiões de descrição das espécies sinonimizadas *P. saudadensis* e *P. densivillosus*.

**FIGURA 13** - Representação gráfica da análise de identificação do valor mais provável de  $K$  para as populações de *P. jauruensis*.



Fonte: Elaborado pela autora. Análise realizada a partir da estatística  $\Delta K$  (EVANNO *et al.*, 2005).

**FIGURA 14** - Resultado da Bayesiana implementada pelo programa STRUCTURE, somente para as populações de *P. jauruensis* anteriormente classificadas como Grupo Norte.



Fonte: Elaborado pela autora. Cada indivíduo é representado por uma barra vertical, apresentando a proporção de seu genoma pertencente a cada um dos grupos estabelecidos. Linhas pretas separam os indivíduos de diferentes populações.

A AMOVA hierarquizada considerando o agrupamento Norte/Sul sugerido pelo STRUCTURE ( $K=2$ ) para as populações de *P.jauruensis* não suportou a divisão entre esse grupos, mostrando que essa estruturação foi modesta e apenas marginalmente significativa (Tabela 6), com as populações dentro dos grupos exibindo maior variação que entre os dois grupos.

**Tabela 6** - Análise de variância molecular para *P. jauruensis* usando o agrupamento de acordo com o resultado da análise com o programa STRUCTURE (PRITCHARD *et al.*, 2000).

Fonte de Variação	%V	F-stat	P
Entre grupos (Sul e Norte)	8,10	$F_{CT} = 0,081$	0,055
Entre populações dentro dos grupos	13,66	$F_{SC} = 0,149$	0,000
Entre indivíduos dentro das populações	33,72	$F_{IS} = 0,431$	0,000

Fonte: Elaborado pela autora.

Uma nova AMOVA hierarquizada considerando três grupos em *P. jauruensis* (Grupo Sul e subgrupos NW e NE) suportou melhor essa divisão, mostrando que o

nível dessa estruturação é maior do que a estruturação em apenas dois grupos principais (Sul e Norte; Tabela 7).

**Tabela 7** - Análise de variância molecular para *P. jauruensis* usando os agrupamentos Sul, NW e NE obtidos de acordo com os resultados das análises com o programa STRUCTURE (PRITCHARD *et al.*, 2000).

Fonte de Variação	%V	F-stat	P
Entre grupos (Sul, NW, NE)	10,46	$F_{CT} = 0,105$	0,013
Entre populações dentro dos grupos	10,28	$F_{SC} = 0,115$	0,000
Entre indivíduos dentro das populações	33,72	$F_{IS} = 0,431$	0,000

Fonte: Elaborado pela autora.

As análises AMOVA realizadas separadamente para os grupos Sul e Norte demonstraram que ambos os grupos apresentam níveis de diferenciação similares entre suas populações, sendo obtido um valor de  $F_{ST}$  igual a 0,153 ( $P = 0,00$ ) para o grupo Sul e um valor de 0,145 ( $P = 0,00$ ) para o grupo Norte. Essa mesma análise realizada para os dois subgrupos formados dentro do grupo Norte mostram um valor de  $F_{ST}$  igual a 0,152 ( $P = 0,00$ ) para as populações do subgrupo NW e 0,101 ( $P = 0,00$ ) para as populações do subgrupo NE. Em conjunto, os resultados do programa STRUCTURE, da AMOVA e os valores de  $F_{ST}$  mostram que a estrutura em *P. jauruensis* é melhor explicada pela reunião das populações em três conjuntos, aqui denominados Grupo Sul, Subgrupo NW e Subgrupo NE.

#### 4.3.4 Correlação Genética e Geográfica (Teste de Mantel)

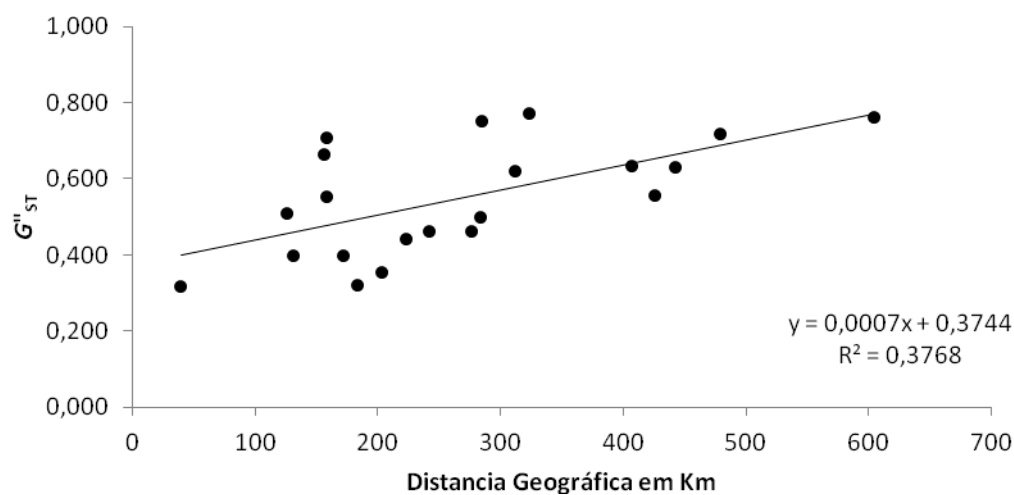
O teste de Mantel, relacionando os valores par a par de  $G''_{ST}$  e distância geográfica (Tabela 8), resultou em correlação significativa ( $r = 0,614$ ;  $P = 0,010$ ) quando foram incluídas na análise apenas as populações de *P. jauruensis* (Figura 15). Com a inclusão das populações de *P. vilaboensis* (Figura 16) na análise, a correlação foi maior ( $r = 0,714$ ;  $P = 0,010$ ). Esses resultados sugerem que o fluxo gênico pode ser um fator determinante no nível de estrutura genética em *P. jauruensis*. O nível maior de correlação observado com a inclusão de *P. vilaboensis* deve refletir a maior distância geográfica e diferenciação genética entre populações de espécies diferentes.

**Tabela 8** - Valores de  $G''_{ST}$  par a par para as sete populações de *Pilosocereus jauruensis* e as duas populações de *Pilosocereus vilaboensis* (diagonal inferior) e distância geográfica em Km (diagonal superior), utilizadas para a estimativa do Teste de Mantel.

	AQU	RVE	ALC	COX	PET	MIN	PGO	GOV	PIR
AQU		183,71	323,73	223,12	425,68	478,94	604,29	767,47	882,65
RVE	0,321		158,29	39,7	242,07	311,94	442,25	611,76	734,42
ALC	0,771	0,707		125,49	158,26	155,91	284,7	453,52	576,32
COX	0,442	0,317	0,509		203,1	275,88	406,79	577,21	701,26
PET	0,557	0,463	0,553	0,356		172,2	283,19	449,15	579,84
MIN	0,717	0,621	0,664	0,463	0,399		131,21	302,67	429,58
PGO	0,762	0,631	0,750	0,635	0,499	0,399		171,77	300,22
GOV	0,722	0,778	0,830	0,697	0,673	0,635	0,590		130,8
PIR	0,742	0,853	0,847	0,760	0,693	0,711	0,698	0,529	

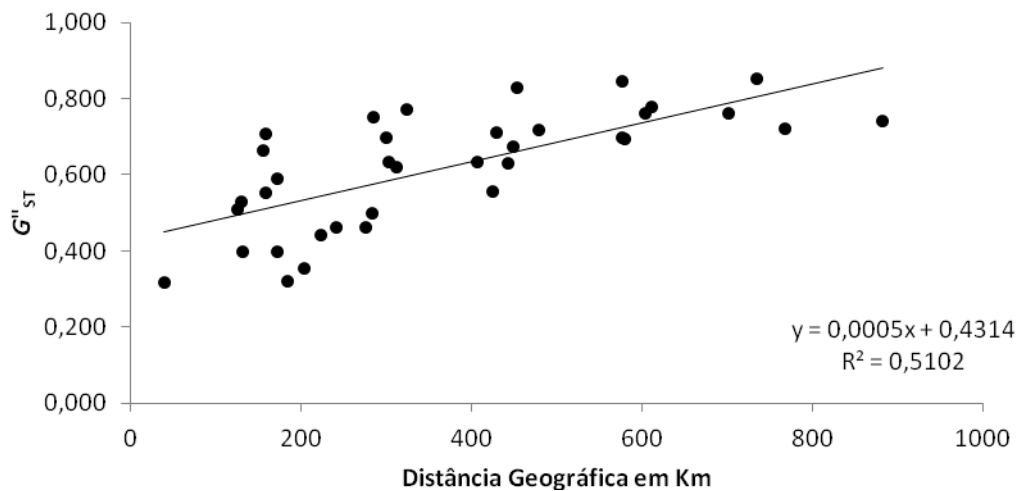
Fonte: Elaborado pela autora.

**FIGURA 15** - Relação entre o índice de fixação  $G''_{ST}$  e distância geográfica considerando na análise de Mantel apenas as populações de *P. jauruensis*.



Fonte: Elaborado pela autora.

**FIGURA 16** - Relação entre o índice de fixação  $G''_{ST}$  e distância geográfica considerando na análise de Mantel para as populações de *P. jauruensis* e *P. vilaboensis*.



Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.2.5 Identificação de Migrantes

A análise de identificação de migrantes realizada pelo programa STRUCTURE apontou a presença de quatro indivíduos migrantes, todos eles com origem na população COX. Dois desses indivíduos (S24A4 e S24A15) foram identificados na população RVE, um indivíduo (S100B9) na população PET e um indivíduo (S101A4) na população MIN. Os resultados obtidos pelo programa GENECLASS2 também apontaram esses mesmos indivíduos como migrantes. Essa análise também apontou outros seis indivíduos como possíveis migrantes de primeira geração vindos de outras populações amostradas e cinco indivíduos migrantes de populações não amostradas (Tabela 9).

Dentre os dez migrantes de primeira geração apontados somente pelo programa GENECLASS2, três indivíduos foram identificados na população AQU e provenientes das populações RVE (S23B10) e populações não amostradas (S23B29 e S23B33), um indivíduo na população ALC proveniente de uma população não amostrada (S25A1), um na população COX proveniente de RVE (S53A10), três na população de PET, sendo um deles proveniente da população COX (S100A1), um de população não amostrada (S100B12) e um de RVE (S100B13), e um indivíduo apontado como migrante na população MIN proveniente da população PGO (S101A27) e por fim um indivíduo da

populaçã PGO apontado como migrante vindo de MIN (S98A1). Três eventos de migração identificados pelo programa GENECLASS2 envolveram as populações geograficamente próximas COX e RVE, e outros quatro eventos envolveram migração dessas populações para populações do grupo Norte. Esse mesmo padrão (migração entre COX e RVE e dessas populações para populações do grupo Norte) foi apontado com um número menor de eventos pela análise com o programa STRUCTURE.

**TABELA 9** - Análise de detecção de migrantes utilizando os programa GENECLASS2 (PIRY *et al.* 2004) e STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD *et al.* 2000).

Indivíduo migrante	GeneClass		Structure	
	Origem geográfica	Provável população fonte	Origem geográfica	Provável população fonte
S23B10	AQU	RVE	-	-
S23B29	AQU	Não amostrada	-	-
S23B33	AQU	Não amostrada	-	-
S24A4	RVE	COX	RVE	COX
S24A15	RVE	COX	RVE	COX
S25A1	ALC	Não amostrada	-	-
S53A10	COX	RVE	-	-
S100A1	PET	COX	-	-
S100B9	PET	COX	PET	COX
S100B12	PET	Não amostrada	-	-
S100B13	PET	RVE	-	-
S101A4	MIN	COX	MIN	COX
S101A27	MIN	PGO	-	-
S98A1	PGO	MIN	-	-

Fonte: Elaborado pela autora. Para cada migrante são apresentadas a população em que foi amostrado e a provável população fonte, quando amostrada.

Dentre os dez migrantes de primeira geração apontados somente pelo programa GENECLASS2, três indivíduos foram identificados na população AQU e provenientes das populações RVE (S23B10) e populações não amostradas (S23B29 e S23B33), um



indivíduo na população ALC proveniente de uma população não amostrada (S25A1), um na população COX proveniente de RVE (S53A10), três na população de PET, sendo um deles proveniente da população COX (S100A1), um de população não amostrada (S100B12) e um de RVE (S100B13), e um indivíduo apontado como migrante na população MIN proveniente da população PGO (S101A27) e por fim um indivíduo da população PGO apontado como migrante vindo de MIN (S98A1). Três eventos de migração identificados pelo programa GENECLASS2 envolveram as populações geograficamente próximas COX e RVE, e outros quatro eventos envolveram migração dessas populações para populações do grupo Norte. Esse mesmo padrão (migração entre COX e RVE e dessas populações para populações do grupo Norte) foi apontado com um número menor de eventos pela análise com o programa STRUCTURE.

#### 4.2.6 Gargalo Populacional

Os testes de adequação ao equilíbrio mutação-deriva utilizando o programa BOTTLENECK não mostrou resultados significativos ( $P < 0,05$ ) para ocorrência recente de gargalos populacionais (Tabela 10).

**TABELA 10.** Análise da alteração do equilíbrio mutação-deriva mostrando a probabilidade de excesso e deficiência de heterozigotos e probabilidade de ocorrência de gargalo populacional recente utilizando o modelo TPM e teste de probabilidade de Wilcoxon.

População	Deficiência de heterozigotos	Excesso de heterozigotos	<i>P</i>
AQU	0,84961	0,17969	0,35938
RVE	0,27832	0,75391	0,55664
ALC	0,93555	0,08203	0,16406
COX	0,31250	0,72168	0,62500
PET	0,95801	0,05273	0,10547
MIN	0,31250	0,72168	0,62500
PGO	0,94727	0,06543	0,13086

Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.2.7 Relações de Similaridade Genética

Foram calculados os parâmetros  $F_{ST}$  (Tabela 11),  $D_c$  (*chord distance*; Tabela 12) (CAVALLI-SFORZA; EDWARDS, 1967) e  $D$  (Tabela 13) (JOST, 2008) para estimar a distância genética entre pares de populações e posterior construção de dendogramas *Neighbour-Joining* (SAITOU; NEI, 1987) no programa POPULATIONS 1.2.31 (LANGELLA, 1999).

**TABELA 11** - Valores de  $F_{ST}$  par a par para as sete populações de *Pilosocereus jauruensis* e as duas populações de *Pilosocereus vilaboensi* utilizadas para elaboração de dendogramas *Neighbour-Joining*.

	AQU	RVE	ALC	COX	PET	MIN	PGO	GOV	PIR
AQU									
RVE	0,087								
ALC	0,213	0,195							
COX	0,115	0,089	0,141						
PET	0,118	0,100	0,126	0,079					
MIN	0,165	0,142	0,158	0,104	0,073				
PGO	0,167	0,137	0,168	0,133	0,086	0,076			
GOV	0,216	0,233	0,255	0,199	0,162	0,163	0,145		
PIR	0,216	0,251	0,253	0,212	0,161	0,178	0,166	0,165	

Fonte: Elaborado pela autora.

**TABELA 12** - Valores de *Dc* par a par para as sete populações de *Pilosocereus jauruensis* e as duas populações de *Pilosocereus vilaboensis* utilizadas para elaboração de dendogramas *Neighbour-Joining*.

	AQU	RVE	ALC	COX	PET	MIN	PGO	GOV	PIR
AQU									
RVE	0,424								
ALC	0,642	0,589							
COX	0,474	0,398	0,546						
PET	0,535	0,460	0,533	0,415					
MIN	0,634	0,539	0,549	0,501	0,398				
PGO	0,673	0,559	0,635	0,576	0,506	0,438			
GOV	0,642	0,696	0,699	0,673	0,648	0,600	0,602		
PIR	0,641	0,744	0,727	0,699	0,641	0,631	0,662	0,508	

Fonte: Elaborado pela autora.

**TABELA 13** - Valores de *D* par a par para as sete populações de *Pilosocereus jauruensis* e as duas populações de *Pilosocereus vilaboensis* utilizadas para elaboração de dendogramas *Neighbour-Joining*.

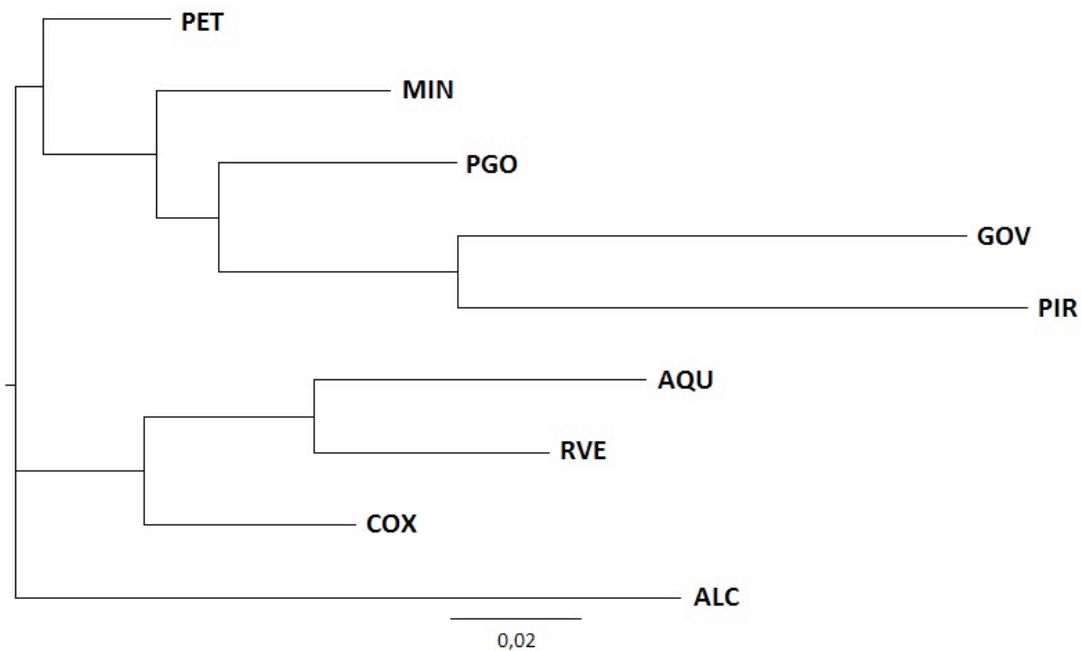
	AQU	RVE	ALC	COX	PET	MIN	PGO	GOV	PIR
AQU									
RVE	0,216								
ALC	0,668	0,597							
COX	0,323	0,223	0,396						
PET	0,453	0,367	0,461	0,277					
MIN	0,614	0,512	0,565	0,364	0,322				
PGO	0,677	0,534	0,673	0,546	0,426	0,321			
GOV	0,580	0,656	0,731	0,565	0,560	0,506	0,470		
PIR	0,609	0,763	0,759	0,646	0,588	0,597	0,592	0,360	

Fonte: Elaborado pela autora.

Todos os dendogramas formados com as diferentes medidas de distância genética apresentaram agrupamento das populações em três ramos principais. Em todos eles, a população de ALC ficou alocada em um ramo distinto e sem a definição da relação com os outros ramos.

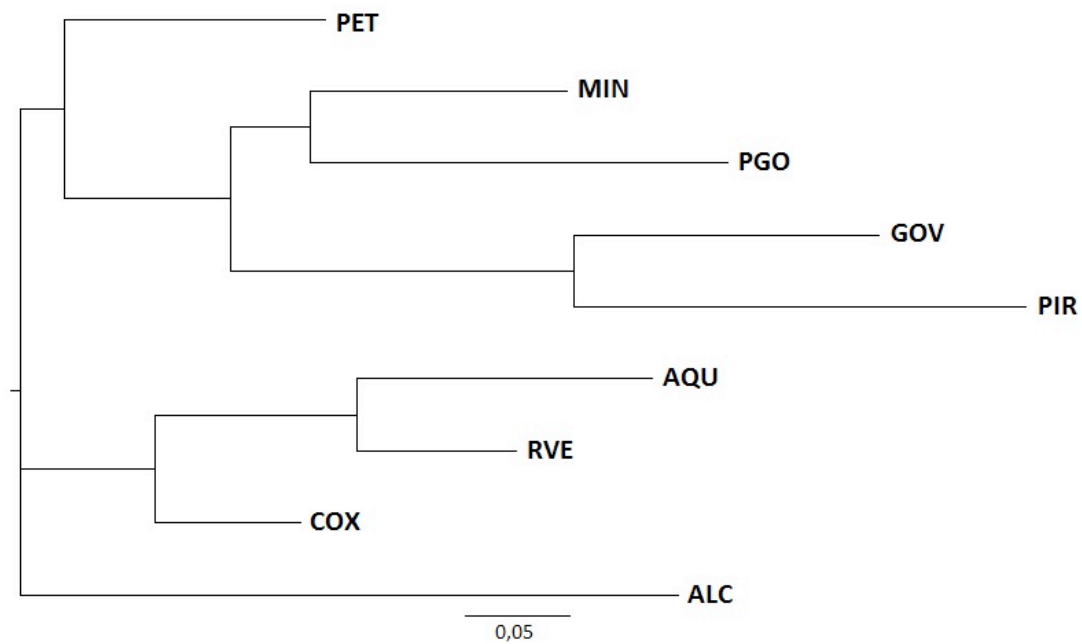
Os dendogramas baseados nos valores de  $F_{ST}$  e  $D$  (Figuras 17 e 18 respectivamente) concordaram em alocar em um único ramo as populações de *P. jauruensis* que ocorrem ao longo da Serra de Maracaju (AQU, RVE e COX), concordando com a composição do grupo Sul revelado pela análise de estrutura populacional. Os dendogramas obtidos com as distâncias  $F_{ST}$  e  $D$  também concordaram em agrupar as populações MIN e PGO de *P. jauruensis* com as populações de *P. vilaboensis*, juntamente com a população PET de *P. jauruensis* ocupando uma posição mais distante nesse ramo;

**FIGURA 17** - Dendograma de *Neighbor-joining* mostrando as relações entre as populações de *P. jauruensis* e *P. vilaboensis* a partir da estimativa de  $F_{ST}$ .



Fonte: Elaborado pela autora.

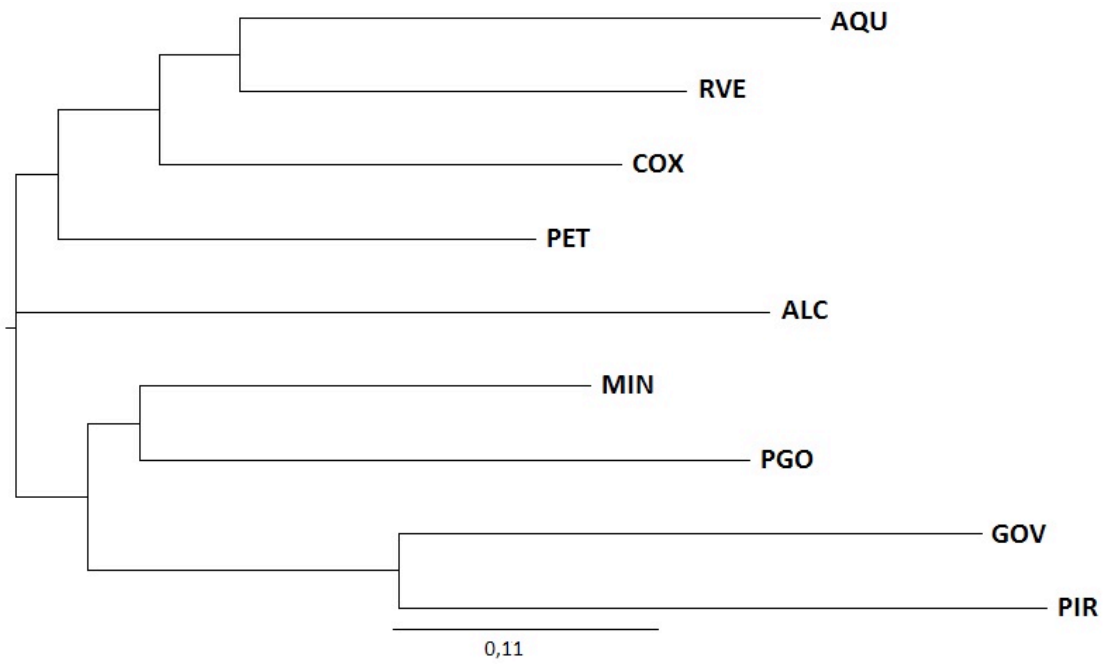
**FIGURA 18** - Dendograma de *Neighbor-joining* mostrando as relações entre as populações de *P. jauruensis* e *P. vilaboensis* a partir das estimativas de *D*.



Fonte: Elaborado pela autora.

O dendrograma construído a partir das distâncias  $D_c$  (Figura 19) também evidenciou a divisão norte e sul entre as populações de *P. jauruensis*, com exceção da população PET (grupo Norte) que foi agrupada com as populações AQU, RVE e COX (grupo SUL). Assim como nos dendogramas apresentados anteriormente, a relação entre a população ALC e as outras populações não foi resolvida. Também nesse dendrograma as populações de *P. vilaboensis* foram agrupadas com as populações MIN e PGO de *P. jauruensis*.

**FIGURA 19** - Dendograma de *Neighbor-joining* mostrando as relações entre as populações de *P. jauruesis* e *P. vilaboensis* a partir da estimativa *Dc*.



Fonte: Elaborado pela autora.

## 5. DISCUSSÃO

A análise do programa MICRO-CHECKER apontou a presença de alelos nulos em 6 dentre os 8 locos de microssatélites utilizados. No entanto, optamos por manter os genótipos originais para a realização das análises visto que os valores de  $F_{ST}$  obtidos com os dados originais não diferiram de forma significativa dos valores de  $F_{ST}$  obtidos a partir das frequências alélicas corrigidas para a presença de alelos nulos.

Vários trabalhos atuais têm defendido a utilização dos dados originais quando não se observa diferenças significativas dos valores corrigidos em relação aos valores originais da estimativa  $F_{ST}$  (AGOSTINI *et al.*, 2013; AZPILICUETA *et al.*, 2013; HURTADO *et al.*, 2013; GIANTSIS *et al.*, 2014).

As análises realizadas indicam uma elevada diferenciação genética e pouco fluxo gênico recente entre as populações de *P. jauruensis*. Isto é verificado a partir dos altos valores de  $F_{ST}$  e  $G_{ST}$  e pela ocorrência de alelos exclusivos em alta frequência encontrados em quatro das sete populações estudadas. Esses resultados estão de acordo com a hipótese de elevada estruturação populacional devido a distribuição fragmentada da espécie.

Os altos índices de diversidade genética observados neste trabalho é maior do que a variabilidade genética encontrada para espécies que apresentam o mesmo padrão de distribuição disjunta como a de *P. jauruensis*. Barbara *et al.* (2007) verificaram para espécies de bromélias do gênero *Alcantarea* um número médio de alelos por população variando entre 4,8 a 6,5 e  $H_E$  média de 0,495. Moreira *et al.* (2008) encontraram para a espécie *Cocoloba cereifera* (arbusto endêmico de campos rupestres no Leste do Brasil) um número médio de alelos por população entre 2,2 e 3,0 e  $H_E$  média de 0,324. Elevada variabilidade genética em populações naturais de cactos é uma observação relativamente comum na literatura. Por exemplo, Contreras-Negrete *et al.* (2014) observaram para a espécie *Polaskia chende*, endêmica da região central do México, índices de diversidade genética também bastante elevados e compatíveis com os níveis observados em *P. jauruensis* ( $n_A$  médio = 5,6,  $H_O$  médio = 0,70 e  $H_E$  médio = 0,65).

Estudos de diversidade genética utilizando marcadores aloenzimáticos em cactáceas (FIGUEREDO *et al.*, 2010) também revelaram níveis relativamente altos de variabilidade genética, comparáveis com níveis elevados obtidos pela utilização deste mesmo marcador encontrados para espécies perenes e lenhosas (HAMRICK *et al.*, 1992).

Para cactos colunares, os níveis de diversidade genética aparentam não sofrer reduções em relação a populações com distribuição ampla se comparados com os índices encontrados para populações de distribuição restrita. Esses resultados são demonstrados tanto por marcadores de aloenzimas (NASON *et al.*, 2002; CLARK-TAPIA; MOLINA-FREANER, 2003; NASSAR *et al.*, 2003; MORAES *et al.*, 2005; CASAS *et al.*, 2006; CASAS *et al.*, 2007; FIGUEREDO *et al.*, 2010) quanto para marcadores microssatélites (OTERO-ARNAIZ *et al.*, 2004; ARAKAKI *et al.*, 2010; PARRA *et al.*, 2010; MORAES *et al.*, 2013). Embora os resultados de diversos estudos mostrem que populações restritas parecem não sofrer perda da diversidade genética, o menor número de alelos encontrado na população de ALC deve estar relacionado com o tamanho populacional reduzido nessa localidade, o que acentuaria os efeitos da deriva genética. Entretanto, esse fato parece não interferir no índice de diversidade genética, que se mantém alto e compatível com os valores obtidos para as demais populações.

Desvios em relação ao esperado pelo EHW e altos valores de  $F_{IS}$  foram detectados para todas as populações em estudo. Esses resultados podem apontar para um efeito de endogamia nas populações. No entanto essa deficiência de heterozigotos em seis dos 10 locos analisados (*Pmac84*, *Pmac85*, *Pmac108*, *Pmac135*, *Pmac146* e *Pmac149*) deve estar associada a presença de alelos nulos nesses locos.

As espécies vegetais diferem marcadamente quanto ao modo como a diversidade genética é particionada entre as populações. O padrão de partição geralmente está correlacionado com os sistemas de reprodução e o estilo de vida (HAMRICK *et al.*, 1992). Espécies com ciclo de vida longo, como encontrado em Cactáceas, geralmente apresentam maior diversidade genética dentro das populações do que entre. Estudos com plantas de reprodução mista (sexuada e assexuada) mostram que a diversidade não é necessariamente reduzida dentro das populações quando comparadas com plantas de reprodução exclusivamente por via sexuada. Segundo Cavallari (2004), foram detectados altos níveis de diversidade em algumas populações de espécies de Bromeliaceae com sistema misto de reprodução, assim como foi visto para as populações de *P. jauruensis*. Essa manutenção da diversidade genética em populações de distribuição restrita, além de estar relacionada aos diferentes métodos reprodutivos encontrados nas diferentes espécies de cactaceas, pode ser resultante de conexões históricas que devem ter ocorrido no período quaternário permitindo assim a ocorrência de fluxo gênico e redução dos impactos ocasionados pela deriva genética (MORAES *et al.*, 2012).



Quanto às relações genéticas entre as populações analisadas, os resultados obtidos neste trabalho mostram-se consistentes considerando ambos marcadores (plastidiais e microssatélites). O compartilhamento do haplótipo H1 entre as populações AQU, RVE e COX é concordante com a menor diferenciação nos locos microssatélites entre essas populações, com a identificação de migrantes entre elas e com a reunião dessas populações no Grupo Sul inferido pelo programa Structure. Além disso, a presença de dois haplótipos distintos nas populações PET e ALC em relação ao haplótipo H1, também reforça a existência do grupo NE inferido pelo programa Structure. Por fim, o compartilhamento do haplótipo H4 pelas populações PGO e MIN e a estreita relação desse haplótipo com os haplótipos das populações de *P. vilaboensis* (H5 e H6), em conjunto com a grande distância mutacional de H4 com os outros haplótipos de *P. jauruensis*, suporta a existência do grupo NW inferido pelo programa Structure e a maior proximidade genética desse grupo com *P. vilaboensis* do que com as outras populações de *P. jauruensis*. Esta observação também foi suportada pelas relações entre as populações evidenciada pela distância *Dc*. Em conjunto, esses resultados suportam a hipótese da existência de diferentes segmentos populacionais dentro de *P. jauruensis*, sendo um deles mais proximamente relacionado com *P. vilaboensis*. As populações do subgrupo NE (MIN e PGO) estão na região da Serra dos Caiapós, área descrita como de ocorrência do táxon inválido *P. densivillosus*, sugerindo que essa distinção genética pode suportar a existência de um táxon distinto nessa região. Da mesma maneira, a acentuada diferenciação genética das populações ALC e PET (subgrupo NW) em relação as outras populações de *P. jauruensis* do Grupo Sul também pode indicar a presença de um táxon distinto, visto que essas populações ocorrem na área descrita para a ocorrência do táxon inválido *P. saudadensis*. A presença de alelos exclusivos somente nas populações ALC, PET, MIN e PGO reforçam a ideia de maior diferenciação dessas populações em relação àquelas encontradas na Serra de Maracajú, no estado de Mato Grosso do Sul.

A proximidade genética observada entre as populações do Subgrupo NE com as populações de *P. vilaboensis* pode ser resultado de fluxo gênico possibilitado por contato ocasionado por conexões históricas entre esses dois táxons. Recentemente Bonatelli *et al.* (20014) demonstraram em uma análise filogeográfica associada com modelagem da distribuição passada do nicho climático do grupo *P. ARISETUS*, que a distribuição dessas espécies foi mais ampla durante fases glaciais do Pleistoceno médio, possibilitando o contato entre linhagens que diferenciaram em isolamento.

Incongruências taxonômicas reveladas por dados moleculares podem não apenas ser resultado de arranjos taxonômicos incorretos. A observação de tais incongruências pode também resultar de retenção de polimorfismo ancestral de espécies que divergiram recentemente ou ainda de introgressão de genes de uma espécie no genoma de outra. Petit e Excoffier (2009) demonstraram recentemente que marcadores moleculares com níveis limitados de fluxo gênico são mais propensos a introgressão, e portanto menos adequados para delimitar espécies. Pelo fato da dispersão de sementes ser considerada menos efetiva que a movimentação de pólen entre populações (ELLSTRAND, 1992), marcadores plastidiais devem exibir níveis reduzidos de fluxo gênico em comparação aos nucleares e assim a variação nos marcadores plastidiais deve ser mais influenciada pelo padrão geográfico que taxonômico. Os resultados obtidos com os marcadores plastidiais no presente trabalho apontam uma incongruência taxonômica envolvendo as populações de *P. jauruensis* de Goiás e *P. vilaboensis*. Embora esse resultado possa ser sinal de introgressão entre as duas espécies, os resultados das análises feitas com marcadores de cpDNA são consistentes com os resultados obtidos pelos marcadores microssatélites, reforçando que as populações do grupo NE estão mais proximamente relacionadas com as populações de *P. vilaboensis* do que com as populações de *P. jauruensis*.

Analisando o resultado da estrutura populacional apontada pelo  $\Delta K = 2$ , obtido pelo programa STRUCTURE, percebemos que o agrupamento em Grupos Norte e Sul não reflete a estrutura populacional predominante na espécie, uma vez que o resultado da AMOVA hierárquica apontou maior variação genética dentro que entre esses grupos. Uma nova análise utilizando as populações do Grupo Norte, que são compostas pelas populações coletadas nas áreas de ocorrência das espécies sinonimizadas, revelou a existência de dois subgrupos adicionais dentro desse Grupo Norte, agrupando as populações de forma compatível com as áreas geográficas de descrição dos táxons sinonimizados. Uma nova AMOVA hierárquica considerando esse novo agrupamento (Grupo Sul e Subgrupos NE e NW) revelou que um nível de variação molecular entre grupos foi maior que a hipótese de apenas dois grupos. Esse resultado é condizente com os resultados de similaridade genética, nos quais as populações do grupo NE são agrupadas em um mesmo ramo com base na distância  $D_C$  e no agrupamento das populações do grupo Sul com base nas distâncias  $F_{ST}$  e  $D$ .

Os resultados obtidos por ambos marcadores mostram uma estreita relação entre as populações do grupo Sul. Essas populações podem se mostrar mais diferenciadas das

outras por estarem isoladas a mais tempo. Os resultados obtidos por Bonatelli *et al.* (2014) corroboram essa hipótese, uma vez que demonstraram que a área onde essas populações ocorrem permaneceram separadas de outras áreas durante as fases de expansão da distribuição nos períodos glaciais, quando possibilitou maior conectividade entre as populações de outras espécies.

A possível existência de táxons distintos entre as populações amostradas pode ter contribuído para os resultados de elevada estruturação e fluxo gênico restrito, uma vez que a análise conjunta desses possíveis táxons incluiria os efeitos do isolamento reprodutivo entre espécies diferentes. É possível que esta diversidade genética esteja refletindo a classificação adotada por Ritter (1979) que descreveu o taxon *P. saudadensis* com ocorrência na região da Serra do Roncador (MT) e Braun e Esteves Pereira (1994) que descreveram o táxon *P. densivillosus* com ocorrência na região da Serra dos Caiapós (GO).

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, mesmo sendo relativamente pequenas e isoladas, as populações de *P. jauruensis* estão mantendo altos níveis de diversidade genética. Os resultados obtidos nesse trabalho também indicam a possível existência de dois taxóons distintos entre as populações ao norte da distribuição de *P. jauruensis*. Essas observações são de fundamental importância para a elaboração de estratégias de conservação. Muitas das populações amostradas estão em áreas particulares e não fazem parte de áreas destinadas a parques ou reservas. Salientando que espécies de cactáceas apresentam alto valor ornamental, as populações de *P. jauruensis* se mostram em risco eminente de coleta indiscriminada.

## 6. CONCLUSÃO

Os níveis de diversidade genética encontrados nas populações de *P. jauruensis* são relativamente altos considerando a distribuição fragmentada da espécie e estão de acordo com os níveis de diversidade genética encontrados em outras espécies de cactáceas, incluindo as espécies relacionadas de *Pilosocereus* do Grupo *AURISSETUS*.

Foram observados altos índices de estruturação genética e diferenciação populacional, o que está de acordo com a distribuição fragmentada e baixo fluxo gênico. Esses altos índices podem estar relacionados também com possíveis incongruências taxonômicas, já que os resultados apontam que os táxons considerados inválidos *P. saudadensis* e *P. densivillosus* formam grupos genéticos distintos em relação a *P. jauruensis*.

Por fim, os resultados desse estudo apontam que a taxonomia de *P. jauruensis* deve ser revista, com especial atenção para a análise de possíveis diferenças morfológicas de valor taxonômico entre as áreas sul (Serra de Maracaju), noroeste (Serra do Roncador) e nordeste (Serra dos Caiapós) da distribuição da espécie.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINI, C. et al. Putative selected markers in the Chionodraco Genus detected by interspecific outlier tests. *Polar Biology*, v. 36, n. 10, p.1509-1518, 2013.
- ANDERSON, E.F. *The cactus family*. Portland, Oxford: Timber Press, 2001. 776p.
- ARAKAKI, M. et al. Characterization of Polymorphic Microsatellite Loci in Haageocereus (Trichocereae, Cactaceae). *American Journal of Botany* Vol. 97, No. 3, E17-E19, 2010.
- AVISE, J. C. Phylogeography: Retrospect and Prospect. *Journal of Biogeography* Vol. 36, No. 1, 3-15, 2009.
- AZPILICUETA, M. M. et al. Management of Nothofagus Genetic Resources: Definition of Genetic Zones Based on a Combination of Nuclear and Chloroplast Marker Data. *Forest Ecology and Management* Vol. 302, 414-424, 2013.
- BAKER, M. A.; BUTTERWORTH C. A. Geographic Distribution and Taxonomic Circumscription of Populations within Coryphantha Section Robustispina (Cactaceae). *American Journal of Botany* Vol. 100, No. 5, 984-997, 2013.
- BARBARA, T. et al. Population Differentiation and Species Cohesion in Two Closely Related Plants Adapted to Neotropical High-Altitude 'Inselbergs', Alcantarea Imperialis and Alcantarea Genuculata (Bromeliaceae). *Molecular Ecology* Vol. 16, No. 10, 981-992, 2007.
- BARBOSA, A. R. et al. Geographical Genetic Structuring and Phenotypic Variation in the Vellozia Hirsuta (Velloziaceae) Ochlopecies Complex. *American Journal of Botany* Vol. 99, No. 9, 1477-1488, 2012.
- BHARGAVA, A.; Fuentes, F. F. Mutational Dynamics of Microsatellites. *Molecular Biotechnology* Vol. 44, No. 3, 250-266, 2010.
- BRAUN, P.J. Zur Kenntnis von *Pilosocereus juaruensis* (Buining et Brederoo ex Brederoo et Theunissen). *Deutsche Kakt. u. a. Sukk.* Vol. 37, No. 10, 197-203, 1986.
- BRAUN, P. J. and E. Esteves Pereira. Cactaceae *Pilosocereus densivillosus*. *Kakteen and Sukk* Vol. 45, No. 114, 1994.
- BONATELLI, I. A. S. et al. Interglacial Microrefugia and Diversification of a Cactus Species Complex: Phylogeography and Palaeodistributional Reconstructions for *Pilosocereus Aurisetus* and Allies. *Molecular Ecology* Vol. 23, No. 12, 3044-3063, 2014.

- BONATELLI, I. A. et al. Usefulness of Cpdna Markers for Phylogenetic and Phylogeographic Analyses of Closely-Related Cactus Species. *Genet Mol Res* Vol. 12, No. Aop, 2013.
- BREDEROO, A.; Theunissen J. Pseudopilocereus Juaruensis Buining Et Brederoo Spec. Nov. Vol. 29, No. 7, 153-155, 1978.
- CAETANO, S. et al. The History of Seasonally Dry Tropical Forests in Eastern South America: Inferences from the Genetic Structure of the Tree Astronium Urundeuva (Anacardiaceae). *Molecular Ecology* Vol. 17, No. 13, 3147-3159, 2008.
- CASAS, A. et al. Maintenance of Phenotypic and Genotypic Diversity in Managed Populations of Stenocereus Stellatus (Cactaceae) by Indigenous Peoples in Central Mexico. *Biodiversity and Conservation* Vol. 15, No. 3, 879-898, 2006.
- CASAS, A. et al. In Situ Management and Domestication of Plants in Mesoamerica. *Annals of Botany* Vol. 100, No. 5, 1101-1115, 2007.
- CAVALLARI, M.M. Estrutura genética de populações de *Encholirium* (Bromeliaceae) e implicações para sua conservação. 92p. Dissertação de mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, 2004.
- CAVALLI-SFORZA, L.I.; Edwards, A. W. F. Phylogenetic Analysis - Models and Estimation Procedures. *Evolution* Vol. 21, No. 3, 550-&, 1967.
- CHAPUIS, M. P.; ESTOUP, A. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution* Vol. 24, No. 3, 621-631, 2007.
- CHARLESWORTH, B. Measures of Divergence between Populations and the Effect of Forces That Reduce Variability. *Molecular Biology and Evolution* Vol. 15, No. 5, 538-543, 1998.
- CLARK-TAPIA, R.; MOLINA-FREANER, F. The Genetic Structure of a Columnar Cactus with a Disjunct Distribution: Stenocereus Gummosus in the Sonoran Desert. *Heredity* Vol. 90, No. 6, 443-450, 2003.
- CLEMENT, M. et al. Tcs: A Computer Program to Estimate Gene Genealogies. *Molecular Ecology* Vol. 9, No. 10, 1657-1659, 2000.
- CONTRERAS-NEGRETE, G. et al. Genetic diversity and structure of wild and managed populations of Polaskia chende (Cactaceae) in the Tehuaca'n-Cuicatla'n Valley, Central Mexico: insights from SSR and allozyme markers. *Genet Resour Crop Evol* Vol. 10, No. 10, 137-140, 2014.

CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and Power Analysis of Two Tests for Detecting Recent Population Bottlenecks from Allele Frequency Data. *Genetics* Vol. 144, No. 4, 2001-2014, 1996.

CORNUET, J. M. et al. New Methods Employing Multilocus Genotypes to Select or Exclude Populations as Origins of Individuals. *Genetics* Vol. 153, No. 4, 1989-2000, 1999.

CROW, J.; KIMURA, M. *An introduction to population genetics theory*. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1970.

DEMASURE, B. et al. A Set of Universal Primers for Amplification of Polymorphic Noncoding Regions of Mitochondrial and Chloroplast Dna in Plants. *Molecular Ecology* Vol. 4, No. 1, 129-131, 1995.

Dias, V. C.; Moraes, E. M. Triagem Da Variação Nucleotídica em Regiões do Genoma Plastidial de Cactáceas para Estudos Filogeográficos E Filogenéticos. In: Anais de Eventos da UFSCar - XX Congresso de Iniciação Científica da UFSCar, São Carlos, SP, 2013.

DI RIENZO, A. et al. Mutational Processes of Simple-Sequence Repeat Loci in Human Populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Vol. 91, No. 8, 3166-3170, 1994.

DUMOLIN-LAPEGUE, S. et al. An Enlarged Set of Consensus Primers for the Study of Organelle Dna in Plants. *Molecular Ecology* Vol. 6, No. 4, 393-397, 1997.

ELLSTRAND N. C. Gene Flow among Seed Plant Populations. *New Forests* Vol. 6, 241-256, 1992.

ENNOS, R. A. et al. Conserving Taxonomic Complexity. *Trends in Ecology & Evolution* Vol. 20, No. 4, 164-168, 2005.

ESTOUP, A. et al. Homoplasmy and Mutation Model at Microsatellite Loci and Their Consequences for Population Genetics Analysis. *Molecular Ecology* Vol. 11, No. 9, 1591-1604, 2002.

EVANNO, G. et al. Detecting the Number of Clusters of Individuals Using the Software Structure: A Simulation Study. *Molecular Ecology* Vol. 14, No. 8, 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L. et al. Arlequin (Version 3.0): An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. *Evolutionary Bioinformatics* Vol. 1, 47-50, 2005.

FAHN, A.; CUTLER, D. F. *Xerophytes*. Gebriider Borntraeger. Berlin, 1992.

- FIGUEREDO, C. J. et al. Population Genetic Diversity and Structure of *Pilosocereus Tillianus* (Cactaceae, Cereaceae), a Columnar Cactus Endemic to the Venezuelan Andes. *Journal of Arid Environments* Vol. 74, No. 11, 1392-1398, 2010.
- FRANCO, F. F.; MANFRIN, M. H. Recent Demographic History of Cactophilic *Drosophila* Species Can Be Related to Quaternary Palaeoclimatic Changes in South America. *Journal of Biogeography* Vol. 40, No. 1, 142-154, 2013.
- FRANKHAM, R. Genetics and Extinction. *Biological Conservation* Vol. 126, No. 2, 131-140, 2005.
- GIANTSIS, I. A. et al. Microsatellite Variation of Mussels (*Mytilus Galloprovincialis*) in Central and Eastern Mediterranean: Genetic Panmixia in the Aegean and the Ionian Seas. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* Vol. 94, No. 4, 797-809, 2014.
- GIBSON, A.; NOBEL, P. *The cactus primer*. Howard Universit Press. Cambrigde, 1986.
- GOMES, V. S. D. et al. Potential Role of Frugivorous Birds (Passeriformes) on Seed Dispersal of Six Plant Species in a Restinga Habitat, Southeastern Brazil. *Revista De Biologia Tropical* Vol. 56, No. 1, 205-216, 2008.
- GOUDET, J. Fstat (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity* Vol. 86, No. 6, 485-486, 1995.
- HALL, T. A. Bioedit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/Nt. (Ed.)^(Eds.), Nucleic Acids Symposium Series, 1999.
- HAMILTON, J. A.; ECKERT, C. Population Genetic Consequences of Geographic Disjunction: A Prairie Plant Isolated on Great Lakes Alvars. *Molecular Ecology* Vol. 16, No. 8, 1649-1660, 2007.
- HAMRICK, J. L. et al. Factors Influencing Levels of Genetic Diversity in Woody Plant-Species. *Population Genetics of Forest Trees* Vol. 42, 95-124, 1992.
- HANCOCK, J. M. The Contribution of Slippage-Like Processes to Genome Evolution. *Journal of Molecular Evolution* Vol. 41, No. 6, 1038-1047, 1995.
- HEDRICK, P. W. A Standardized Genetic Differentiation Measure. *Evolution* Vol. 59, No. 8, 1633-1638, 2005.
- HELSEN, P. et al. Isolation and Characterization of Polymorphic Microsatellite Markers in Galapagos Prickly Pear (*Opuntia*) Cactus Species. *Molecular Ecology Notes* Vol. 7, No. 3, 454-456, 2007.



- HOLSINGER, K. E.; WEIR, B. S. Fundamental Concepts in Genetics Genetics in Geographically Structured Populations: Defining, Estimating and Interpreting F<sub>st</sub>. *Nature Reviews Genetics* Vol. 10, No. 9, 639-650, 2009.
- HUGHES, C. E. et al. From Famine to Feast? Selecting Nuclear Dna Sequence Loci for Plant Species-Level Phylogeny Reconstruction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* Vol. 361, No. 1465, 211-225, 2006.
- HUNT, D. R.; TAYLOR, N. P. The genera of the Cactaceae: progress towards consensus. *Bradleya* Vol. 8, 85-107, 1990.
- HUNT, D. et al. *The New Cactus Lexicon, Atlas & Text.*, Dh Books, 2006.
- HURTADO, L. A. et al. Genetic Differentiation of a Primitive Teleost, the African Bonytongue *Heterotis niloticus*, among River Basins and within a Floodplain River System in Benin, West Africa. *Journal of Fish Biology* Vol. 83, No. 3, 682-690, 2013.
- JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N. A. Clump: A Cluster Matching and Permutation Program for Dealing with Label Switching and Multimodality in Analysis of Population Structure. *Bioinformatics* Vol. 23, No. 14, 1801-1806, 2007.
- JONES, R. C. et al. Genetic Diversity and Mating System of an Endangered Tree *Eucalyptus morrisbyi*. *Australian Journal of Botany* Vol. 53, No. 4, 367-377, 2005.
- JOST, L. G<sub>st</sub> and Its Relatives Do Not Measure Differentiation. *Molecular Ecology* Vol. 17, No. 18, 4015-4026, 2008.
- KIMURA, M.; CROW, J. F. Number of Alleles That Can Be Maintained in Finite Population. *Genetics* Vol. 49, No. 4, 725-&, 1964.
- LAMBERT, S. M. et al. Allozyme Diversity and Morphometrics of the Endangered *Melocactus glaucescens* (Cactaceae), and Investigation of the Putative Hybrid Origin of *Melocactus* X *Albicephalus* (*Melocactus Ernestii* X *M. glaucescens*) in North-Eastern Brazil. *Plant Species Biology* Vol. 21, No. 2, 93-108, 2006(a).
- LAMBERT, S. M. et. al. Allozyme Diversity and Morphometrics of *Melocactus paucispinus* (Cactaceae) and Evidence for Hybridization with *M. concinnus* in the Chapada Diamantina, North-Eastern Brazil. *Annals of Botany* Vol. 97, No. 3, 389-403, 2006(b).
- LANDRUM, J. V. Four Succulent Families and 40 Million Years of Evolution and Adaptation to Xeric Environments: What Can Stem and Leaf Anatomical Characters Tell Us About Their Phylogeny? *Taxon* Vol. 51, No. 3, 463-473, 2002.
- LANGELLA, O. Populations, 1.2.30. 1999. Disponível em: <<http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>>, último acesso: set/2014.

- LESICA, P.; ALLENDORF, F. W. When Are Peripheral-Populations Valuable for Conservation. *Conservation Biology* Vol. 9, No. 4, 753-760, 1995.
- LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological Determinants of Genetic-Structure in Plant-Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* Vol. 15, 65-95, 1984.
- MADDISON, W. P. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.752011. Disponível em: <<http://mesquiteproject.org>>, último acesso: set/2014.
- MANEL, S. et al. Detecting Wildlife Poaching: Identifying the Origin of Individuals with Bayesian Assignment Tests and Multilocus Genotypes. *Conservation Biology* Vol. 16, No. 3, 650-659, 2002.
- MANTEL, N. Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. *Cancer Research* Vol. 27, No. 2P1, 209-&, 1967.
- MEIRMANS, P. G.; HEDRICK, P. W. Assessing Population Structure: F-St and Related Measures. *Molecular Ecology Resources* Vol. 11, No. 1, 5-18, 2011.
- MORAES, E. M. et. al. Population Genetic Structure of Two Columnar Cacti with a Patchy Distribution in Eastern Brazil. *Genetica* Vol. 125, No. 2-3, 311-323, 2005.
- MORAES, E. M. et al. Cross-Species Amplification of Microsatellites Reveals Incongruence in the Molecular Variation and Taxonomic Limits of the *Pilosocereus Aurisetus* Group (Cactaceae). *Genetica* Vol. 140, No. 7-9, 277-285, 2012.
- MORAES, E. M. et al. Phylogeography of the Cactophilic Species *Drosophila Gouveai*: Demographic Events and Divergence Timing in Dry Vegetation Enclaves in Eastern Brazil. *Journal of Biogeography* Vol. 36, No. 11, 2136-2147, 2009.
- MORAES, E. M. et al. Cross-Species Amplification of Microsatellites Reveals Incongruence in the Molecular Variation and Taxonomic Limits of the *Pilosocereus Aurisetus* Group (Cactaceae) (Vol 140, Pg 277, 2012). *Genetica* Vol. 141, No. 4-6, 269-271, 2013.
- MOREIRA, R. G. et al. Isolation and Characterization of Microsatellite Loci in *Coccoloba Cereifera* (Polygonaceae), an Endangered Species Endemic to the Serra Do Cipo, Brazil. *Molecular Ecology Resources* Vol. 8, No. 4, 854-856, 2008.
- MUNGUIA-ROSAS, M. A. et al. Removal of *Pilosocereus Leucocephalus* (Cactaceae, Tribe Cereeae) Seeds by Ants and Their Potential Role as Primary Seed Dispersers. *Journal of Arid Environments* Vol. 73, No. 4-5, 578-581, 2009.
- MUNGUIA-ROSAS, M. A. et al. Pollination System of the *Pilosocereus Leucocephalus* Columnar Cactus (Tribe Cereeae) in Eastern Mexico. *Plant Biology* Vol. 12, No. 4, 578-586, 2010.

- NASON, J. D. et al. Historical Vicariance and Postglacial Colonization Effects on the Evolution of Genetic Structure in *Lophocereus*, a Sonoran Desert Columnar Cactus. *Evolution* Vol. 56, No. 11, 2214-2226, 2002.
- NASSAR, J. M. et al. Population Genetic Structure of Venezuelan Chiropterophilous Columnar Cacti (Cactaceae). *American Journal of Botany* Vol. 90, No. 11, 1628-1637, 2003.
- NAUTA, M. J.; WEISSING, F. J. Constraints on Allele Size at Microsatellite Loci: Implications for Genetic Differentiation. *Genetics* Vol. 143, No. 2, 1021-1032, 1996.
- NOVAES, R. M. L. et al. Phylogeography of *Plathymenia Reticulata* (Leguminosae) Reveals Patterns of Recent Range Expansion Towards Northeastern Brazil and Southern Cerrados in Eastern Tropical South America. *Molecular Ecology* Vol. 19, No. 5, 985-998, 2010.
- OHTA, T.; KIMURA, M. A Model of Mutation Appropriate to Estimate the Number of Electrophoretically Detectable Alleles in a Finite Population. *Genetics Research* Vol. 89, No. 5-6, 367-370, 2007.
- OLIVEIRA, E. J. et al. Origin, Evolution and Genome Distribution of Microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* Vol. 29, No. 2, 294-307, 2006.
- OTERO-ARNAIZ, A. et al. Isolation and Characterization of Microsatellites in the Columnar Cactus: *Polaskia Chichipe* and Cross-Species Amplification within the Tribe Pachycereeae (Cactaceae). *Molecular Ecology Notes* Vol. 4, No. 2, 265-267, 2004.
- OUBORG, N. J. et al. The Rough Edges of the Conservation Genetics Paradigm for Plants. *Journal of Ecology* Vol. 94, No. 6, 1233-1248, 2006.
- PAETKAU, D. et al. Genetic Assignment Methods for the Direct, Real-Time Estimation of Migration Rate: A Simulation-Based Exploration of Accuracy and Power. *Molecular Ecology* Vol. 13, No. 1, 55-65, 2004.
- PARRA, F. et al. Evolution under Domestication: Ongoing Artificial Selection and Divergence of Wild and Managed *Stenocereus Prinosus* (Cactaceae) Populations in the Tehuacan Valley, Mexico. *Annals of Botany* Vol. 106, No. 3, 483-496, 2010.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. Genalex 6.5: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research-an Update. *Bioinformatics* Vol. 28, No. 19, 2537-2539, 2012.
- PEREZ, M. F. et al. Isolation, Characterization, and Cross-Species Amplification of Polymorphic Microsatellite Markers for *Pilosocereus Machrisii* (Cactaceae). *American Journal of Botany* Vol. 98, No. 8, E204-E206, 2011.

- PETIT, R. J.; EXCOFFIER, L. Gene Flow and Species Delimitation. *Trends in Ecology & Evolution* Vol. 24, No. 7, 386-393, 2009.
- PIRY, S. et al. GeneClass2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity* Vol. 95, No. 6, 536-539, 2004.
- PIRY, S. et al. Bottleneck: A Computer Program for Detecting Recent Reductions in the Effective Population Size Using Allele Frequency Data. *Journal of Heredity* Vol. 90, No. 4, 502-503, 1999.
- PRITCHARD, J. K. et al. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* Vol. 155, No. 2, 945-959, 2000.
- RANNALA, B.; MOUNTAIN, J. L. Detecting Immigration by Using Multilocus Genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Vol. 94, No. 17, 9197-9201, 1997.
- RAVI, V. et al. An Update on Chloroplast Genomes. *Plant Systematics and Evolution* Vol. 271, No. 1-2, 101-122, 2008.
- RICE, W. R. Analyzing Tables of Statistical Tests. *Evolution* Vol. 43, No. 1, 223-225, 1989.
- RITTER, F. Cactaceae *Pilosocereus Saudadensis*. *Kakteen Südamerika*. Vol. 1, No. 82. 1979.
- ROZAS, J. et al. Dnasp, Dna Polymorphism Analyses by the Coalescent and Other Methods. *Bioinformatics* Vol. 19, No. 18, 2496-2497, 2003.
- SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-Joining Method - a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution* Vol. 4, No. 4, 406-425, 1987.
- SCHAAL, B. A. et al. Phylogeographic Studies in Plants: Problems and Prospects. *Molecular Ecology* Vol. 7, No. 4, 465-474, 1998.
- SCHLÖTTERER, C. Evolutionary Dynamics of Microsatellite Dna. *Chromosoma* Vol. 109, No. 6, 365-371, 2000.
- SHAW, J. et al. The Tortoise and the Hare II: Relative Utility of 21 Noncoding Chloroplast Dna Sequences for Phylogenetic Analysis. *American Journal of Botany* Vol. 92, No. 1, 142-166, 2005.
- SHAW, J. et al. Comparison of Whole Chloroplast Genome Sequences to Choose Noncoding Regions for Phylogenetic Studies in Angiosperms: The Tortoise and the Hare III. *American Journal of Botany* Vol. 94, No. 3, 275-288, 2007.

- TABERLET, P. et al. Universal Primers for Amplification of 3 Noncoding Regions of Chloroplast Dna. *Plant Molecular Biology* Vol. 17, No. 5, 1105-1109, 1991.
- TAYLOR, N. P. Cacti and their habitats. *Cactaceae Systematics Initiatives* Vol. 28, 5–15, 2012.
- TAYLOR, N. P.; ZAPPI, D. C. *The Cacti of Eastern Brazil.*, 2004.
- THOMPSON, J. D. et al. Clustal-W - Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Research* Vol. 22, No. 22, 4673-4680, 1994.
- TOTH, G. et al. Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research* Vol. 10, No. 7, 967-981, 2000.
- VAN OOSTERHOUT, C. et al. Micro-Checker: Software for Identifying and Correcting Genotyping Errors in Microsatellite Data. *Molecular Ecology Notes* Vol. 4, No. 3, 535-538, 2004.
- VIARD, F. et al. Variation of Microsatellite Size Homoplasmy across Electromorphs, Loci, and Populations in Three Invertebrate Species. *Journal of Molecular Evolution* Vol. 47, No. 1, 42-51, 1998.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population-Structure. *Evolution* Vol. 38, No. 6, 1358-1370, 1984.
- WHITLOCK, M. C. G '(St) and D Do Not Replace F-St. *Molecular Ecology* Vol. 20, No. 6, 1083-1091, 2011.
- YOUNG, A. et al. The Population Genetic Consequences of Habitat Fragmentation for Plants. *Trends in Ecology & Evolution* Vol. 11, No. 10, 413-418, 1996.
- ZAPPI, D.C. *Pilosocereus (Cactaceae): The Genus in Brazil.* (Ed.)^(Eds.), Royal Botanic Gardens, 1994.
- ZAPPI, D.C. et al. *Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil.*, 2010.

**ANEXOS**

## ANEXO 1

**FIGURA 20** - Prancha utilizada para identificação de *P. jauruensis*, localidade Palestina de Goiás.**PRANCHA 1: Palestina de Goiás**  
Identificada como *Pilosocereus jauruensis*

Fonte: Elaborado pela autora. Pranchas enviadas para os taxonomistas do grupo Dr. Nigel Taylor (Singapore Botanic Gardens) e pela Dra. Daniela Zappi (Royal Botanic Garden).

## Anexo 2

**FIGURA 21** - Prancha utilizada para identificação de *P. Jauruensis*, localidade Serra da Petrovina(1).

**PRANCHA 2: Serra da Petrovina - Ponto 1**  
(100 km sudeste de Rondonópolis, em direção a Alto Araguaia)  
Identificada como *Pilosocereus jauruensis*

Observação: durante a noite a flor aberta tem cheiro forte, adocicado e parecido com cheiro de carne.



Fonte: Elaborado pela autora. Pranchas enviadas para os taxonomistas do grupo Dr. Nigel Taylor (Singapore Botanic Gardens) e pela Dra. Daniela Zappi (Royal Botanic Garden).



## Anexo 3

**FIGURA 22** - Prancha utilizada para identificação de *P. jauruensis*, localidade Serra da Petrovina(2).

**PRANCHA 3: Serra da Petrovina - Ponto 2**

(100 km sudeste de Rondonópolis, em direção a Alto Araguaia)

Identificada como *Pilosocereus jauruensis*

Observação: Local houve queimada e os cactos sobreviveram sobre as pedras



Fonte: Elaborado pela autora. Pranchas enviadas para os taxonomistas do grupo Dr. Nigel Taylor (Singapore Botanic Gardens) e pela Dra. Daniela Zappi (Royal Botanic Garden).

## Anexo 4

**TABELA 14** - Índices de diversidade genética para cada um dos 10 locos microssatélites por população de *P. jauruensis*.

Loco	$n_G$	$n_A$	$A_R$	$H_O/H_E$	$F_{IS}$	$n_G$	$n_A$	$A_R$	$H_O/H_E$	$F_{IS}$
	Aquidauana-MS (AQU)					Rio Verde Goiás-MS (RVE)				
<i>Pmac82</i>	33	1	1,0	0,000/0,000	0,000	16	4	3,1	0,125/0,383*	0,681
<i>Pmac84</i>	33	4	2,4	0,212/0,508*	0,586**	20	4	2,6	0,100/0,345*	0,715**
<i>Pmac85</i>	33	5	3,7	0,455/0,673*	0,366	20	8	6,2	0,350/0,824*	0,582**
<i>Pmac102</i>	33	4	3,4	0,515/0,536	0,039	20	5	3,0	0,200/0,415	0,525
<i>Pmac108</i>	32	8	4,6	0,469/0,703	0,337	20	7	5,1	0,450/0,759*	0,413
<i>Pmac128</i>	33	3	2,7	0,515/0,556	0,092	19	4	3,5	0,053/0,627*	0,918**
<i>Pmac130</i>	33	4	2,8	0,576/0,493	-0,171	20	3	2,5	0,200/0,528*	0,627**
<i>Pmac135</i>	20	5	3,9	0,350/0,676	0,488**	19	4	3,3	0,474/0,664*	0,293
<i>Pmac146</i>	33	8	5,2	0,364/0,768*	0,530**	18	7	5,0	0,222/0,690*	0,684**
<i>Pmac149</i>	33	5	4,3	0,545/0,744	0,270	17	3	2,8	0,353/0,613	0,432
Média	31,6	4,7	3,4	0,400/0,567	0,302	18,9	4,9	3,7	0,253/0,585	0,575**
	Alcinópolis-MS (ALC)					Coxim-MS (COX)				
<i>Pmac82</i>	8	2	2,0	0,750/0,533	-0,448	13	4	2,8	0,308/0,2866	-0,079
<i>Pmac84</i>	8	3	2,8	0,250/0,575	0,582	13	3	2,5	0,077/0,465*	0,840**
<i>Pmac85</i>	8	5	4,8	0,250/0,792*	0,699	13	6	5,0	0,462/0,717	0,366
<i>Pmac102</i>	8	1	1,0	0,000/0,000	0,000	13	5	4,3	0,462/0,735	0,382
<i>Pmac108</i>	8	6	5,9	0,250/0,883*	0,731**	13	6	5,0	0,615/0,686	0,107
<i>Pmac128</i>	8	4	3,7	0,125/0,442	0,731**	13	6	4,9	0,308/0,742	0,595**
<i>Pmac130</i>	8	5	4,8	0,750/0,725	-0,037	13	5	4,0	0,769/0,729	-0,057
<i>Pmac135</i>	8	4	3,9	0,000/0,767*	1,000**	12	5	4,1	0,333/0,623	0,476
<i>Pmac146</i>	8	5	4,8	0,375/0,800	0,548	12	3	2,8	0,250/0,598	0,593
<i>Pmac149</i>	7	2	2,0	0,000/0,527	1,000**	12	5	4,3	0,333/0,721	0,549**
Média	7,9	3,7	3,6	0,275/0,604	0,563**	12,7	4,8	4,0	0,392/0,630	0,389**
	Serra Petrovina-MT (PET)					Mineiros-GO (MIN)				
<i>Pmac82</i>	29	8	5,4	0,310/0,805*	0,619**	28	7	4,7	0,607/0,685	0,116
<i>Pmac84</i>	30	5	3,6	0,367/0,640*	0,431**	31	4	3,3	0,226/0,594*	0,624**
<i>Pmac85</i>	30	12	7,0	0,500/0,868*	0,428**	32	10	6,8	0,594/0,852*	0,307
<i>Pmac102</i>	30	6	4,5	0,100/0,663*	0,851**	32	7	4,8	0,188/0,668*	0,722**
<i>Pmac108</i>	30	6	4,6	0,367/0,759*	0,521**	32	6	4,8	0,344/0,786*	0,566**
<i>Pmac128</i>	27	9	6,1	0,185/0,815*	0,776**	31	5	3,1	0,484/0,578*	0,165
<i>Pmac130</i>	30	5	4,2	0,300/0,739*	0,598**	32	6	4,4	0,438/0,604	0,279
<i>Pmac135</i>	30	8	5,4	0,233/0,768*	0,700**	29	7	5,0	0,483/0,752*	0,362
<i>Pmac146</i>	30	6	4,2	0,167/0,609*	0,730**	28	5	4,1	0,286/0,631*	0,552**
<i>Pmac149</i>	29	5	4,1	0,276/0,710*	0,615**	32	8	4,8	0,438/0,663	0,344
Média	29,5	7,0	4,9	0,280/0,738	0,624**	30,7	6,5	4,6	0,409/0,681	0,404**

## Continuação

Loco	$n_G$	$n_A$	$A_R$	$H_O/H_E$	$F_{IS}$
Palestina de Goiás-GO (PGO)					
<i>Pmac82</i>	19	4	2,9	0,368/0,570*	0,360
<i>Pmac84</i>	19	5	4,3	0,579/0,676*	0,147
<i>Pmac85</i>	20	9	6,5	0,550/0,853*	0,361
<i>Pmac102</i>	20	12	6,3	0,500/0,809*	0,388
<i>Pmac108</i>	17	7	5,3	0,176/0,806*	0,786**
<i>Pmac128</i>	14	6	5,6	0,143/0,844*	0,836**
<i>Pmac130</i>	20	4	3,2	0,350/0,535*	0,351
<i>Pmac135</i>	20	5	4,6	0,450/0,760*	0,414**
<i>Pmac146</i>	17	5	4,6	0,294/0,786*	0,633**
<i>Pmac149</i>	20	4	3,3	0,500/0,683*	0,273
Média	18,6	6,1	4,6	0,391/0,732	0,473**

Fonte: Elaborado pela autora. Sendo:  $n_G$ , número de genótipos;  $n_A$ , número de alelos;  $A_R$ , riqueza alélica;  $H_O$ , Heterozigozidade observada;  $H_E$ , Heterozigozidade esperada; \*, valores que apresentaram desvio significativo para EHW após a correção de Bonferroni; \*\*, valores significativos de  $F_{IS}$  após a correção de Bonferroni.